



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΤΡΙΤΣΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΤΡΙΤΣΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2).





Ημερομηνία αίτησης του κ. Ντρίτσου Γεωργίου: 2-10-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 771<sup>α</sup>/28-11-2014

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ντζάνη Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσιλίδης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-12-2014

«Συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 873<sup>α</sup>/13-11-2018**

Στρατηγός Αλέξανδρος	Καθηγητής Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Ντζάνη Ευαγγελία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πενθερουδάκης Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μάουρι Ντάβιντε	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζουλάκη Ιωάννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιλίδης Κωνσταντίνος	Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 15-11-2018

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Η Γραμματέας του Τμήματος  
  
**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**  




## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με στήριξαν στην διάρκεια αυτών των ετών. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Ευαγγέλου, Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής με έμφαση στην Κλινική και Μοριακή Επιδημιολογία για την καθοδήγησή του και τη συνεχή στήριξή του από τα πρώτα βήματα μου στο χώρο της έρευνας στα τέλη του 2012, μέχρι και σήμερα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ.κ. Τσιλίδη, Ντζάνη, Δημολιάτη για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Ιωάννα Τζουλάκη Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής με έμφαση στην Επιδημιολογία, για την καθοριστική συμβολή της στην έναρξη της ερευνητικής μου δραστηριότητας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κ. Δημήτρη Μαυρίδη, Επίκουρο Καθηγητή Παιδαγωγικού Τμήματος Δημοτικής Εκπαίδευσης με γνωστικό αντικείμενο την Στατιστική στην Εκπαίδευση και στις Κοινωνικές Επιστήμες για τη στήριξη και καθοδήγησή του.

Τέλος, η λέξη «ευχαριστώ» δείχνει να έχει μικρή αξία μπροστά στην ευγνωμοσύνη για όσα μου έχει προσφέρει η οικογένειά μου και οι κοντινοί μου άνθρωποι όλα αυτά τα χρόνια.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το μελάνωμα είναι ένας κακοήθης καρκίνος του δέρματος με σύνθετη αιτιολογία και η ανάπτυξή του θα μπορούσε να θεωρηθεί αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, περιβαλλοντικών εκθέσεων και γενετικών παραγόντων. Δημοσιευμένες μελέτες έχουν δείξει πως η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως τα κόκκινα ή ξανθά μαλλιά και τα ανοιχτόχρωμα μάτια είναι οι βασικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος. Ωστόσο, οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές είχαν μικρό αριθμό περιστατικών μελανώματος. Από την άλλη πλευρά, μελέτες γενετικής συσχέτισης έχουν ανακαλύψει 20 γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη μελανώματος. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές για το μελάνωμα έχουν πραγματοποιηθεί σε πληθυσμούς με ανοιχτόχρωμο δέρμα και για το λόγο αυτό οι συσχετίσεις γενετικών παραγόντων με την ανάπτυξη μελανώματος σε σκουρόχρωμους πληθυσμούς, με υψηλότερη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, όπως είναι ο ελληνικός πληθυσμός, δεν είναι ευρέως γνωστές.

Στη παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια να επικυρωθούν οι γενετικοί τόποι που έχει αποδειχθεί πως έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη μελανώματος σε έναν ελληνικό πληθυσμό, ο οποίος παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον. Επίσης έγινε προσπάθεια ανακάλυψης νέων γενετικών τόπων που σχετίζονται ισχυρά με την ανάπτυξη μελανώματος σε αυτόν τον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και σε μία μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη του Ηνωμένου Βασιλείου, την UK Biobank, η οποία περιλαμβάνει περισσότερους από 500,000 συμμετέχοντες και προσφέρει υψηλή στατιστική ισχύ αξιοποιώντας σύγχρονες μεθόδους διαχείρισης και ανάλυσης πληροφορίας μεγάλης κλίμακας.

Με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων διαχείρισης και ανάλυσης πληροφορίας μεγάλης κλίμακας (big-data), αξιολογήθηκε και εκτιμήθηκε ο ρόλος περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, στην ανάπτυξη μελανώματος και μελετήθηκαν αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος. Εξετάστηκε κατά πόσο ο γενετικός κίνδυνος μπορεί να μεταβληθεί όταν το άτομο υιοθετεί σωστές πρακτικές για την προφύλαξη ανάπτυξης μελανώματος. Τέλος, ελέγχθηκε η αιτιακή σχέση μεταξύ συγκεκριμένων διατροφικών παραγόντων και του κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος με τη χρήση της μεθόδου της Μεντελιανής τυχαιοποίησης.

Απώτερος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός έγκυρου μοντέλου πρόβλεψης που θα συμπεριλαμβάνει περιβαλλοντικούς και φαινοτυπικούς παράγοντες κινδύνου, το γενετικό υπόβαθρο, και τυχόν άγνωστους μέχρι τώρα παράγοντες. Ένα τέτοιο μοντέλο επιτρέπει τον εντοπισμό ενός πληθυσμού-στόχου, όπου ο προσυμπτωματικός έλεγχος διαλογής και η κατάλληλη εκπαίδευση θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας του μελανώματος. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων κινδύνου είναι υψίστης σημασίας για τη δημόσια υγεία δεδομένου ότι τουλάχιστον οι περιβαλλοντικοί (έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία) παράγοντες κινδύνου μπορούν να τροποποιηθούν με τα κατάλληλα προγράμματα αγωγής υγείας μειώνοντας τα νέα περιστατικά.

Η παρούσα διατριβή, προσθέτει επιπλέον επιδημιολογικά στοιχεία για τους παθογενετικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στο μελάνωμα, προσφέροντας νέες προοπτικές στην πρόληψη στο επίπεδο του γενικού πληθυσμού και στην τροποποίηση του κινδύνου σε άτομα με υψηλή γενετική προδιάθεση. Τα ευρήματα της διατριβής θα μπορούσαν να καθοδηγήσουν τη μελλοντική έρευνα στον τομέα της διάγνωσης, πρόγνωσης και διαχείρισης του μελανώματος.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	5
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	7
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1– ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 ΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ.....	11
1.1.1 Γενικά στοιχεία- Εισαγωγή.....	11
1.1.2 Η επιδημιολογία του μελανώματος.....	14
1.1.3 Παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος .....	20
1.1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	20
1.1.3.2 Φαινοτυπικοί παράγοντες .....	21
1.1.3.3 Γενετικοί παράγοντες .....	21
1.1.4 Κλινική διάγνωση και πρόγνωση του μελανώματος .....	22
1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ.....	25
1.2.1 Γενετική επιδημιολογία και μελέτες γενετικής συσχέτισης .....	25
1.2.2 Μελέτες υποψήφιων γονιδίων .....	25
1.2.3 Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος.....	26
1.2.4 Παράδειγμα μελέτης σάρωσης γονιδιώματος μεγάλου μεγέθους δείγματος .....	27
1.2.5 Χρησιμότητα των μελετών σάρωσης γονιδιώματος στην ιατρική πράξη για το μελάνωμα.....	29
1.2.6 Αποτελέσματα από τις μελέτες σάρωσης γονιδιώματος για το μελάνωμα έως τώρα .....	30
1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	35
2.1 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΕΝΑΝ ΝΟΤΙΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΕ ΕΝΑ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	35
2.1.1 Εισαγωγή-Σκοπός .....	35
2.1.2 Μέθοδοι .....	36
2.1.3 Αποτελέσματα.....	46
2.1.4 Συζήτηση.....	57

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΜΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ 11 ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ.....	61
2.2.1 Εισαγωγή-Σκοπός .....	61
2.2.2 Μεθοδολογία .....	62
2.2.3 Αποτελέσματα .....	65
2.2.4 Συζήτηση.....	68
2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ, ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΑΝΩΜΑ .....	70
2.3.1 Εισαγωγή-Σκοπός .....	70
2.3.2 Μεθοδολογία .....	70
2.3.3 Αποτελέσματα .....	75
2.3.4 Συζήτηση.....	87
2.4 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ: ΜΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΝΤΕΛΙΑΝΗΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	90
2.4.1 Εισαγωγή-Σκοπός .....	90
2.4.2 Μεθοδολογία .....	92
2.4.3. Αποτελέσματα .....	95
2.4.4 Συζήτηση.....	101
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	103
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	105
ABSTRACT .....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Επίπτωση μελανώματος ανά ήπειρο. ....	15
Εικόνα 2. Συχνότητα εμφάνισης μελανώματος ανά χώρα. ....	18
Εικόνα 3. Θνησιμότητα μελανώματος ανά ήπειρο. ....	19
Εικόνα 4. Στάδια πάχους του όγκου του μελανώματος. ....	23
Εικόνα 5. Γράφημα Manhattan της μεγαλύτερης έως σήμερα GWAS. ....	29
Εικόνα 6. Συσχέτιση των εκτιμητών ΛΑ που βρέθηκαν στο ελληνικό δείγμα και εκείνων που προέρχονται από την MelGene, την GWAS από την οποία προήλθαν ή τη μελέτη Law et al., 2015. ....	51
Εικόνα 7. Συσχέτιση των συχνοτήτων του αλληλομόρφου κινδύνου στο ελληνικό δείγμα και ενός ευρωπαϊκού πληθυσμού που προέρχεται από την πλατφόρμα 1000G. ....	52
Εικόνα 8. Συσχέτιση ΓΔΚ και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος στα διαφορετικά πεμπτημόρια του ΓΔΚ <sub>ΕΥΡ</sub> και ΓΔΚ <sub>ΣΥΝ</sub> . Οι ΛΑ για την ανάπτυξη μελανώματος ανά πεμπτημόριο συγκρίνονται με τα άτομα στο μέσο πεμπτημόριο και για τα δύο ΓΔΚ. ....	55
Εικόνα 9. Εικόνα από το ερωτηματολόγιο με οθόνη αφής της UK Biobank. ....	71
Εικόνα 10. Αθροιστικοί εκτιμητές κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος κατά τη διάρκεια των ετών παρακολούθησης στις διαφορετικές υποομάδες ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία. ....	79
Εικόνα 11. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου. ....	83
Εικόνα 12. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς την ηλικία των συμμετεχόντων. ....	85
Εικόνα 13. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς τη χρήση αντιηλιακής προστασίας. ....	86
Εικόνα 14. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου θεωρώντας σαν περιπτώσεις μελανώματος μόνο τις ιστολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις επιφανειακώς επεκτεινόμενου μελανώματος. ....	87
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση MR ανάλυσης. ....	91
Εικόνα 16. Διαγράμματα σημείων για τις συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών με κάθε διατροφικό παράγοντα και με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. ....	100



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τύποι Μελανώματος (1) .....	13
Πίνακας 2. Ετήσια συχνότητα εμφάνισης μελανώματος ανα γεωγραφική περιοχή και χώρα .....	16
Πίνακας 3. Γενετικοί τόποι που σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.....	31
Πίνακας 4. Τοποθεσία στο γονιδίωμα, Πηγή απο την οποία προήλθαν και αποτελέσματα γονοτύπησης για τους 59 επιλεγμένους πολυμορφισμούς .....	40
Πίνακας 5. Δημογραφικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μελάνωμα και των υγείων μαρτύρων.....	46
Πίνακας 6. Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα από τη μονοπαραγοντική ανάλυση των 53 επιλεγμένων πολυμορφισμών .....	49
Πίνακας 7. Συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου στον ελληνικό πληθυσμό και σε έναν ευρωπαϊκού πληθυσμού που προέρχεται από την πλατφόρμα 1000G .....	53
Πίνακας 8. Αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας των τριών μοντέλων προγνωστικών παραγόντων κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος στον Ελληνικό πληθυσμό .....	56
Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ ΓΔΚ και ανάπτυξης μελανώματος σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες.....	57
Πίνακας 10. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της GWAS μετα-ανάλυσης και των τριών μελετών επικύρωσης για τη συσχέτιση του rs909253 με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.....	67
Πίνακας 11. Εκτιμητές επίδρασης των αλληλομόρφων κινδύνου των 20 πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο.....	74
Πίνακας 12. Ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία στις υποομάδες γενετικού κινδύνου .	76
Πίνακας 13. Περιγραφικά χαρακτηριστικά, ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και φαινοτυπικοί παράγοντες.....	77
Πίνακας 14. Συσχέτιση μεταξύ ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος .....	78
Πίνακας 15. Συσχέτισης μεταξύ ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος .....	80
Πίνακας 16. Ανάλυση υποομάδων για τη συσχέτιση έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ανάλογα με τον γενετικό κίνδυνο σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες και διαφορετική χρήση αντιηλιακής προστασίας .....	81
Πίνακας 17. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου .....	82
Πίνακας 18. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς την ηλικιακή ομάδα και τη χρήση αντιηλιακής προστασίας των συμμετεχόντων .....	84
Πίνακας 19. Συσχετίσεις των πολυμορφισμών που επιλέχθηκαν για την MR ανάλυση με τους διατροφικούς παράγοντες και τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.....	97
Πίνακας 20. Αποτελέσματα MR ανάλυσης .....	98



**ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

ASR: age-standardised rate

AUC: Area Under the Curve

EGCUT: Estonian Genome Centre, University of Tartu

eQTL: *expression Quantitative Trait Loci*

GEFOS: GEnetic Factors for OSteoporosis

GIANT: Genetic Investigation of ANthropometric Traits

GTEx: Genotype-Tissue Expression

HRC: The Haplotype Reference Consortium

HWE: Hardy–Weinberg equilibrium

ICBP: International Cancer Benchmarking Partnership

IV: Instrumental Variables

IVW: Inverse Variance Weighted

GWAS: Genome-Wide Association Study

LD: Linkage disequilibrium

MR: Mendelian Randomization

MVP: Million Veteran Program

NHS: National Health Service

RCT: randomized controlled trial

SNP: single-nucleotide polymorphism

UVR: ultraviolet radiation

WCRF: World Cancer Research Fund

ΓΔΚ: Γενετικός Δείκτης Κινδύνου

ΔΕ: Διάστημα Εμπιστοσύνης

ΛΑ: Λόγος Αναλογιών

ΛΣΚ: Λόγος Σχετικού Κινδύνου

ΠΚΚ: Περιοχή Κάτωθι της Καμπύλης

ΣΕΑ: Συχνότητα Ελάσσανος Αλληλομόρφου

ΤΣ: Τυπικό Σφάλμα

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΤΟ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

#### 1.1.1 Γενικά στοιχεία- Εισαγωγή

Το μελάνωμα είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του δέρματος. Προέρχεται από τον κακοήγη μετασχηματισμό των μελανοκυττάρων του χοριοεπιδερμικού ορίου και εντοπίζεται κυρίως στο δέρμα, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και στον οφθαλμό (στον επιπεφυκότα και στην ίριδα), στις μήνιγγες καθώς και σε άλλους βλεννογόνους. Τα μελανώματα στην εμφάνισή τους, συνήθως παρουσιάζουν έντονη μελάγχρωση, αλλά υπάρχουν και αμελανωτικοί όγκοι (1, 2). Στις αρχές του 20ου αιώνα το μελάνωμα ήταν ένας σχετικά σπάνιος σε εμφάνιση όγκος, αλλά στη συνέχεια εξελίχθηκε σε έναν πολύ συχνό κακοήγη καρκίνο με σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Η συχνότητα εμφάνισης του αυξάνεται σταθερά από τα μέσα της δεκαετίας του '60, κυρίως σε πληθυσμούς ανοιχτόχρωμου δέρματος (3) και αναμένεται να συνεχίσει να αυξάνεται για αρκετές ακόμα δεκαετίες, κυρίως στους πληθυσμούς του Δυτικού κόσμου (4-6). Το μελάνωμα είναι ο 21<sup>ος</sup> καρκίνος σε συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως (7), ενώ στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι ο 5<sup>ος</sup> καρκίνος στους άνδρες και ο 6<sup>ος</sup> στις γυναίκες σε συχνότητα εμφάνισης (8). Παρά το γεγονός ότι αποτελεί λιγότερο από το 5% όλων των κακοηθειών του δέρματος, προκαλεί την πλειοψηφία (75%) των θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο του δέρματος στον δυτικό κόσμο για το 2018 αναμένονται ~ 287,723 νέες περιπτώσεις μελανώματος παγκοσμίως (1.6% νέων περιπτώσεων καρκίνων) και ~60,712 θάνατοι που οφείλονται στον καρκίνο αυτό (0.6% θανάτων από καρκίνους) (7).

Παρά τη συνεχώς αυξανόμενη θνησιμότητα τις δεκαετίες του '70 και '80 (9, 10), από τις αρχές του '90 τα ποσοστά θνησιμότητας του μελανώματος έχουν σταθεροποιηθεί κυρίως σε Αυστραλία, Ηνωμένες Πολιτείες και ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες, αντανακλώντας ενδεχομένως τα αποτελέσματα της έγκαιρης αναγνώρισης και της διάγνωσης των μελανωμάτων καθώς και την καλύτερη πρόγνωσή τους (11-13).

Το μελάνωμα είναι από τους πιο ιάσιμους καρκίνους όταν εντοπίζεται στα πρώιμα στάδιά του. Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης φτάνει στο ~98% που είναι από τα υψηλότερα σε σύγκριση με άλλους κακοήθεις καρκίνους και το ξεπερνά μόνο ο καρκίνος του προστάτη, του θυρεοειδούς και των όρχεων (8). Τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης μετά την διάγνωση

εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των χωρών της Ευρώπης, που κυμαίνονται από <50% στην Ανατολική Ευρώπη έως >90% στη βόρεια και κεντρική Ευρώπη (14). Πιθανές εξηγήσεις για αυτές τις διαφορές στην επιβίωση μεταξύ των χωρών θεωρούνται τα διαφορετικά επίπεδα αποτελεσματικότητας των προγραμμάτων πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης, η προσβασιμότητα σε επαρκή συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, οι διαφορετικές διαγνωστικές προσεγγίσεις και οι διαφορές στη βιολογία του καρκίνου (14).



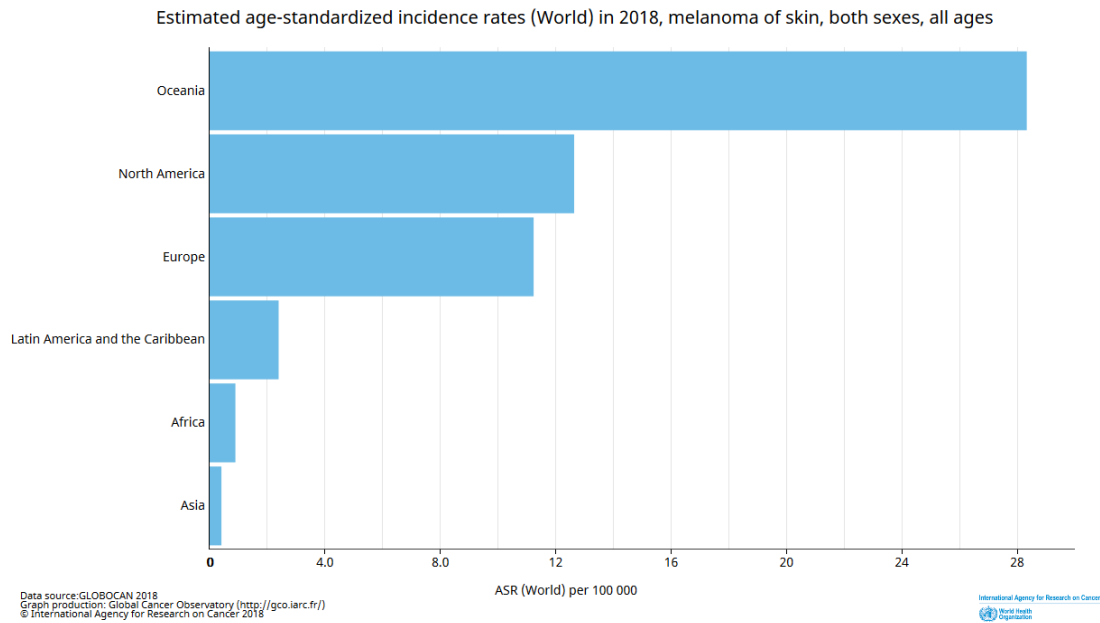
Πίνακας 1: Τύποι Μελανώματος (1)

Επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα	Ξεκινά με μια ενδοεπιδημική φάση οριζόντιας ή ακτινικής ανάπτυξης, εμφανιζόμενη πρώτα ως μια κηλίδα που αργά εξελίσσεται σε πλάκα, και είναι συνήθως πολυχρωματική με ωχρές περιοχές υποστροφής. Σε δεύτερο χρόνο μπορεί να αναπτυχθούν ογκίδια. Ένα χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα είναι η παρουσία ενός επιδερμικού πλευρικού συστατικού με διάχυση των κακοηθών μελανοκυττάρων σε όλη την επιδερμίδα.
Οζώδες μελάνωμα	Εμφανίζεται από την αρχή της ανάπτυξής του ως ένας οζώδης, εξωφυτικός, σκουρόχρωμος (από καφέ έως μαύρος), συχνά διαβρωμένος ή και αιμορραγών όγκος. Σε ιστολογικό επίπεδο παρουσιάζει μία σύντομη οριζόντια φάση ανάπτυξης και στη συνέχεια μία επιθετική κάθετη φάση. Επομένως, η έγκαιρη ανίχνευση, όταν δηλαδή βρίσκεται σε ενδοεπιδερμική στάδιο ανάπτυξης, είναι πρακτικώς αδύνατη.
Μελάνωμα τύπου κακοήθους φακής	Εμφανίζεται συνήθως μετά την πάροδο πολλών ετών σχεδόν αποκλειστικά στο πρόσωπο ηλικιωμένων ασθενών.
Μελάνωμα των άκρων	Είναι συνήθως παλαμοπελματιαίο ή υπο- ή περι- ονύχιο. Στην πρώιμη ενδοεπιδερμική φάση εμφανίζεται ως μία ακανόνιστη, ασαφώς αφοριζόμενη μελάγχρωση, ενώ αργότερα αναπτύσσονται οζίδια που σηματοδοτούν τη διηθητική φάση ανάπτυξης.
Μελάνωμα των βλεννογόνων	Αποτελούν λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων
Δεσμοπλαστικό μελάνωμα	
Αμελανωτικό μελάνωμα	
Πολυποειδές μελάνωμα	

### 1.1.2 Η επιδημιολογία του μελανώματος

Το μελάνωμα εμφανίζεται κυριώς σε λευκούς πληθυσμούς με ανοιχτόχρωμο δέρμα, ενώ πληθυσμοί από την Αφρική και την Ασία αναπτύσσουν σπανιότερους τύπους μελανώματος, όπως μελάνωμα των άκρων και βλεννογόνο μελάνωμα σε χαμηλά ποσοστά εμφάνισης (15). Τις τελευταίες δεκαετίες, η αλλαγή της ψυχαγωγικής συμπεριφοράς των ανθρώπων, έχει σαν συνέπεια την αυξανόμενη έκθεσή τους στον ήλιο. Το γεγονός αυτό θεωρείται πως σχετίζεται με την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του μελανώματος στους λευκούς πληθυσμούς. Κάθε χρόνο, αυτή η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του μελανώματος ποικίλλει μεταξύ των πληθυσμών, κυμαινόμενη από 3% έως 7%, που ισοδυναμεί με διπλασιασμό των ποσοστών ανά 10 έως 20 έτη (16).

Παγκοσμίως, τα ποσοστά εμφάνισης μελανώματος ποικίλουν έως και 100 φορές μεταξύ των ασθενών διαφορετικών πληθυσμών, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται στην Ωκεανία, με ~ 29 νέες περιπτώσεις μελανώματος ανά 100,000 άτομα ετησίως (Εικόνα 1, Πίνακας 2). Στην Ευρώπη, το ποσοστό είναι ~ 11 νέες περιπτώσεις ανά 100,000 ετησίως, ενώ στη Βόρεια Αμερική, το ποσοστό είναι ~ 13 νέες περιπτώσεις ανά 100,000 ετησίως. Πολύ χαμηλά ποσοστά εμφάνισης (<1 ανά 100,000 ετησίως) εκτιμώνται σε σκουρόχρωμους πληθυσμούς από την Αφρική και την Ασία (7) (Εικόνα 1). Τα ποσοστά εμφάνισης μελανώματος ποικίλουν και μεταξύ των χωρών της ίδιας ηπείρου (7, 17). Για παράδειγμα στις χώρες της Β.Ευρώπης (Ελβετία, Ολλανδία, Δανία, Νορβηγία, Σουηδία) κυμαίνονται μεταξύ 18-21 νέων περιπτώσεων ανά 100,000 άτομα ετησίως, αντίθετα με χώρες της Ν.Ευρώπης όπως Ρουμανία, Πορτογαλία, Ισπανία που κυμαίνονται μεταξύ 3-7 νέων περιπτώσεων ανά 100,000 άτομα ετησίως (7, 17) (Εικόνα 2, Πίνακας 2).



### Εικόνα 1. Επίπτωση μελανώματος ανά ήπειρο.

Ποσοστά επίπτωσης του μελανώματος ανά 100,000 κατοίκους ετησίως. Πηγή δεδομενων: GLOBOCAN 2018, <http://gco.iarc.fr>, International Agency for Research on Cancer 2018 (7)

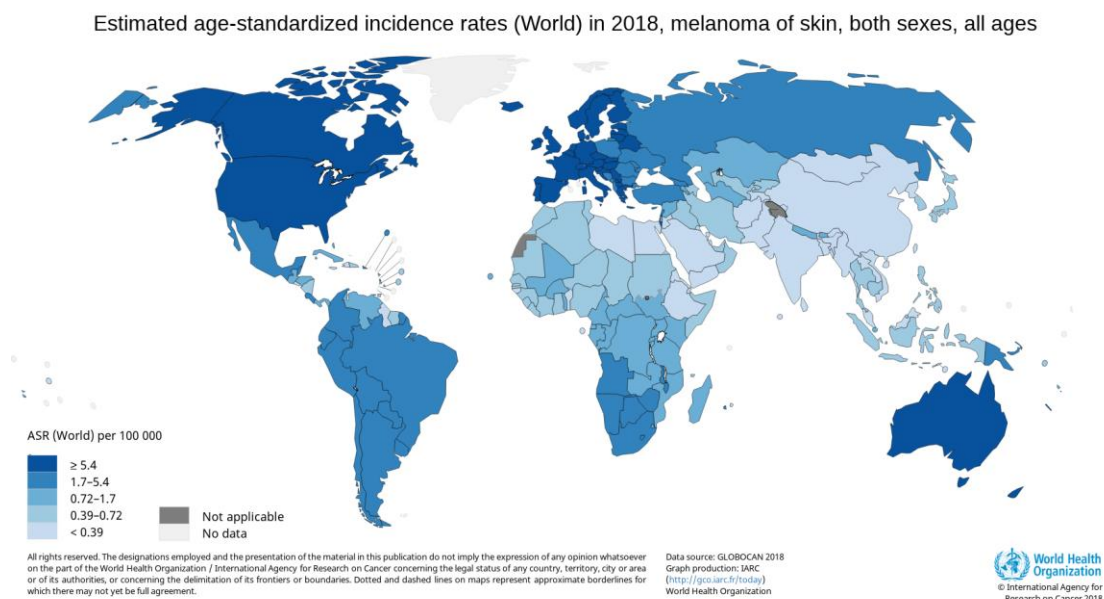
Πίνακας 2. Ετήσια συχνότητα εμφάνισης μελανώματος ανα γεωγραφική περιοχή και χώρα

<i>Πληθυσμός</i>	<i>Συχνότητα εμφάνισης ανα 100,000 άτομα</i>	<i>Συχνότητα εμφάνισης ανα 100,000 άτομα σταθμίζοντας ως προς την ηλικία</i>
Νέα Ζηλανδία	55.4	35.8
<b>Αυστραλία/ Νέα Ζηλανδία</b>	53.8	35.1
Αυστραλία	53.5	34.9
<b>Ωκεανία</b>	39.7	29.8
Ελβετία	32.1	20.3
Ολλανδία	28.7	19.4
Δανία	28.5	19.2
Νορβηγία	30.4	18.8
Σουηδία	30.7	18
<b>Βόρεια Ευρώπη</b>	23.2	14.6
Ηνωμένο Βασίλειο	23	14.6
Η.Π.Α.	21.9	14.3
Τσεχία	20.8	12.6
Φινλανδία	22.4	12.6
Βέλγιο	18	12.1
<b>Δυτική Ευρώπη</b>	19.7	12.1
Ισραήλ	14.4	11.4
Γερμανία	20.6	11.4
Ιταλία	16.4	11.4
Γαλλία	15.6	10.2
Αυστρία	15.8	9.9
Καναδάς	15.5	9.6
<b>Περισσότερο Αναπτυγμένα Κράτη</b>	15.3	9.6
<b>Νότια Ευρώπη</b>	12.2	8.1
Ουγγαρία	11.2	7.1
Σερβία	10.3	7.1
Ισπανία	10.7	6.9

Πορτογαλία	10.3	6.7
Δημοκρατία Ν.Αφρικής	3.7	4.5
<b>Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη</b>	7	4.5
<b>Νότια Αφρική</b>	3.3	4.2
Πολωνία	6.7	4.1
Ρωσία	6.1	4.1
Ουκρανία	6.2	4
Ρουμανία	5.2	3.5
Κολομβία	3.1	3.3
<b>Μικρονησία/Πολυνησία</b>	3.2	3.3
<b>Μικρονησία</b>	3.3	3.1
Αργεντινή	3.6	2.9
Βραζιλία	3.1	2.8
<b>Νότια Αμερική</b>	2.7	2.5
<b>Λατινική Αμερική και Καραϊβική</b>	2.3	2.2
Τουρκία	2.1	2.1
Μεξικό	1.7	1.8
<b>Μέση Αφρική</b>	0.8	1.7
<b>Δυτική Ασία</b>	1.4	1.7
<b>Κεντρική Αμερική</b>	1.5	1.6
<b>Υποσαχάρια Αφρική</b>	0.7	1.3
<b>Κεντροαφρικανική Δημοκρατία</b>	0.7	1.2
<b>Ανατολική Αφρική</b>	0.6	1.1
<b>Μέση Ανατολη και Βόρεια Αφρική (ΜΕΒΑ)</b>	0.9	1.1
<b>Αφρική</b>	0.6	1.1
<b>Λιγότερο Αναπτυγμένα Κράτη</b>	0.7	0.8
<b>Δυτική Αφρική</b>	0.3	0.6
Ιαπωνία	1.1	0.6
Κίνα	0.7	0.6
<b>Ανατολική Ασία</b>	0.8	0.5
<b>Ασία</b>	0.5	0.5
<b>Νοτιοανατολική Ασία</b>	0.4	0.4
<b>Βόρεια Αφρική</b>	0.3	0.4

<b>Νότια-Κεντρική Ασία</b>	0.2	0.3
<b>Ινδία</b>	0.2	0.2

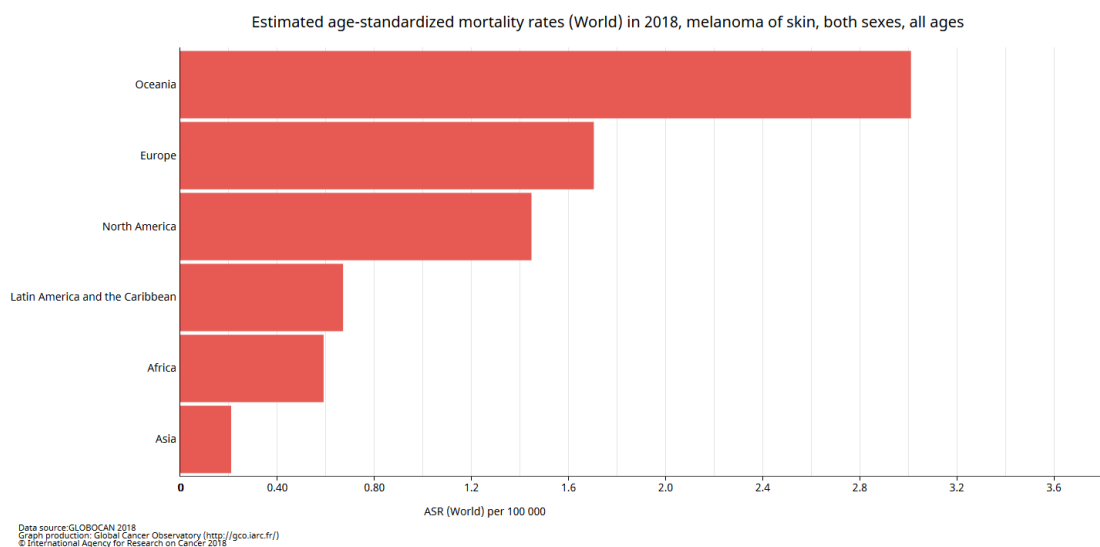
Από τον Πίνακα έχουν εξαιρεθεί χώρες με ετήσια συχνότητα εμφάνισης <1000 άτομα.  
 Πηγή Δεδομένων: Chapter 1, Epidemiology of Melanoma, Natalie H. Matthews, Wen-Qing Li, Abrar A. Qureshi, Martin A. Weinstock, and Eunyoung Cho. (17)



## Εικόνα 2. Συχνότητα εμφάνισης μελανώματος ανά χώρα.

Συχνότητα εμφάνισης μελανώματος ανά 100,000 κατοίκους ετησίως. Πηγή δεδομένων: GLOBOCAN 2018, <http://gco.iarc.fr>, International Agency for Research on Cancer 2018 (7)

Τα ποσοστά θνησιμότητας ποικίλουν και αυτά μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών ηπείρων και φυλών και κυμαίνονται από <0.3 θάνατοι ανά 100,000 άτομα ετησίως στη νότια Ασία έως ~ 3 θάνατοι ανά 100,000 άτομα στην Ωκεανία (Εικόνα 3).



### Εικόνα 3. Θνησιμότητα μελανώματος ανά ήπειρο.

Ποσοστά θνησιμότητας του μελανώματος ανά 100,000 κατοίκους ετησίως. Πηγή δεδομένων: GLOBOCAN 2018, <http://gco.iarc.fr>, International Agency for Research on Cancer 2018 (7)

Η αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης μελανώματος εξακολουθεί να υπάρχει, παρά τις δεκαετίες εκστρατειών δημόσιας πρόληψης σε πολλές χώρες. Είναι ενδιαφέρον πως τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης παρατηρούνται σε άτομα υψηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, πιθανώς αντανακλώντας την εκτεταμένη έκθεση στον ήλιο στον ελεύθερο χρόνο και στην περίοδο των διακοπών τους (18). Μια εξομάλυνση στη συχνότητα εμφάνισης σε κοορτές από την Αυστραλία, όπως αναφέρουν πρόσφατες μελέτες οφείλεται, εν μέρει, στη μετανάστευση νέων από την Ασία στην Ωκεανία, οι οποίοι έχουν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (19, 20).

Από κλινικής πλευράς, το μελάνωμα εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα ηλικίας μεταξύ 40 και 60 ετών, μπορεί όμως να εμφανιστεί και σε έφηβους αλλά και γηραιότερα άτομα ( $\geq 80$  ετών). Η μέση ηλικία διάγνωσης μελανώματος είναι τα 57 έτη (15). Είναι ένας από τους συχνότερους καρκίνους σε άτομα ηλικίας 20-29 ετών και για αυτό η απώλεια ετών ζωής εξαιτίας αυτού του καρκίνου είναι από τις υψηλότερες μεταξύ των διάφορων τύπων καρκίνου (21). Τα πιο συχνά σημεία εμφάνισης μελανώματος είναι στην πλάτη για τους άνδρες και στα κάτω άκρα για τις γυναίκες, στις οποίες παρατηρούνται μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τους άνδρες, σε όλα τα στάδια του όγκου (22, 23).

### 1.1.3 Παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος

Η αιτιολογία του μελανώματος είναι σύνθετη και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (π.χ κόκκινα ή ξανθά μαλλιά, ανοιχτόχρωμα μάτια, ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα), οικογενειακού ιστορικού (24, 25), περιβαλλοντικών εκθέσεων (π.χ. έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία) (26-30) και γενετικών παραγόντων (31).

#### 1.1.3.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVR) είναι ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος. Μια συχνή βλάβη που προκαλεί γενετικά η έκθεση σε UVR, είναι η μετάθεση C>T, η οποία παρατηρείται συχνά στα μελανώματα και οδηγεί σε έναν πολύ υψηλό ρυθμό μετάλλαξης (32). Η έκθεση σε UVR σαν κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος ενισχύεται ακόμα περισσότερο από τον υψηλό επιπολασμό του μελανώματος σε πληθυσμούς που έχουν μεταναστεύσει από περιοχές με χαμηλή σε περιοχές με υψηλή έκθεση σε UVR (33). Η έκθεση αυτή σε άτομα με γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη μελανώματος δημιουργεί μελαγχρωματικούς σπίλους. Τα άτομα που φέρουν >100 σπίλους στο σώμα τους έχουν επτά φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν μελάνωμα κατά τη διάρκεια της ζωής τους σε σχέση με τα άτομα που έχουν μικρό αριθμό σπίλων (<100) (34). Ο κίνδυνος αυτός γίνεται ακόμα μεγαλύτερος όταν η μορφή των σπίλων είναι ασύμμετρα και ακανόνιστη. Ως προς την περιοχή εμφάνισης μελανώματος ανατομικά, μελέτη των Chang YM et al. (35) έδειξε πως η διαλείπουσα έκθεση σε UVR, καθώς και τα εγκαύματα σε παιδική ηλικία είναι ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες για την εμφάνιση μελανώματος στον κορμό και στα άκρα, δηλαδή σημεία που εκτίθενται λιγότερο στον ήλιο. Η έκθεση σε UVR κατά τη διάρκεια της εργασίας σχετίζεται περισσότερο με μελανώματα στον κεφάλι και στον λαιμό, δηλαδή σημεία που εκτίθενται περισσότερο στον ήλιο. Η τελευταία σχέση είναι στατιστικά σημαντική μόνο σε πληθυσμούς που ζουν σε περιοχές χαμηλού υψόμετρου (35, 36).

Η χρήση συσκευών μαυρίσματος (solarium) από άτομα νεαρής ηλικίας αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (37, 38). Για τον λόγο αυτό πολλές χώρες έχουν απαγορεύσει τη χρήση solarium σε παιδιά και έφηβους. Μελέτη του 2012 έδειξε πως το 5.4% των νέων περιπτώσεων μελανώματος που διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο στις 15 χώρες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC) και στα 3 κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ζώνης Ελευθέρων Συναλλαγών (EFTA) οφείλονται στη χρήση solarium (39). Το μεγαλύτερο



ποσοστό αυτής της σχέσης οφείλεται στις γυναίκες καθώς το 6.9% των περιπτώσεων μελανώματος στις γυναίκες οφείλεται στη χρήση solarium εσωτερικού χώρου (39).

### **1.1.3.2 Φαινοτυπικοί παράγοντες**

Οι σημαντικότεροι φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος είναι η ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα, η ασθενής ικανότητα μαυρίσματος, τα κόκκινα ή ξανθά μαλλιά, τα ανοιχτόχρωμα μάτια, οι μελαγχρωματικοί σπίλοι και οι δυσπλασίες τους καθώς και οι φακίδες (25). Η πλειονότητα των μελετών παρατήρησης που έχουν διερευνήσει την επιδημιολογία του μελανώματος, έχουν καταγράψει μία σημαντική αύξηση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος σε ασθενείς με μεγάλο αριθμό μελαγχρωματικών σπύλων καθώς και σε ασθενείς των οποίων οι μορφές των σπύλων είναι ασύμμετρες και ακανόνιστες όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.1.3.1 (34). Εκτός των μελαγχρωματικών σπύλων υπάρχουν και άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Μελέτες έδειξαν πως ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε άτομα με ανοιχτόχρωμα μάτια (πράσινα, μπλε) είναι 62% μεγαλύτερος σε σχέση με άτομα που έχουν σκούρο χρώμα ματιών (40). Ως προς το χρώμα των μαλλιών, ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε άτομα με ανοιχτόχρωμα μαλλιά (ξανθά, κόκκινα και ανοιχτά μελαχρινά) είναι 87% μεγαλύτερος σε σχέση με άτομα που έχουν σκούρο χρώμα μαλλιών (σκούρα μελαχρινά και μαύρα). Ακόμα μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος αν λάβουμε υπόψη μας αποκλειστικά το κόκκινο χρώμα μαλλιών, όπου ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος γίνεται 3.5 φορές μεγαλύτερος (40).

### **1.1.3.3 Γενετικοί παράγοντες**

Οι κληρονομικοί παράγοντες παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην γενετική προδιάθεση ανάπτυξης μελανώματος. Η κληρονομησιμότητα στην ανάπτυξη μελανώματος εκτιμάται στο 58%, ένα από τα υψηλότερα ποσοστά μεταξύ των καρκίνων (41). Έχει αποδειχθεί πως το οικογενειακό ιστορικό σχετίζεται με διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος και πως το ποσοστό της εμφάνισης μελανώματος στο γενικό πληθυσμό που οφείλεται στην κληρονομικότητα ποικίλει μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών (0.007 στην Ευρώπη και 0.064 στην Αυστραλία) (42). Με την άνθηση του πεδίου της γενετικής και τη χρήση των μελετών σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) απαντήθηκαν πολλά ερωτήματα

για την αιτιοπαθογένεια του μελανώματος (43). Οι GWAS έχουν ανακαλύψει ~ 20 γενετικούς τόπους που σχετίζονται σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Οι γενετικοί αυτοί τόποι εξηγούν το 19.2% του σχετικού κινδύνου του μελανώματος που οφείλεται στην κληρονομικότητα, με το γονίδιο MC1R μόνο, να εξηγεί το 5.3% (44). Πέντε γενετικοί τόποι βρίσκονται σε περιοχές που σχετίζονται με την μελάγχρωση, τρεις σε περιοχές που σχετίζονται με τον αριθμό των σπύλων και τέσσερις σε περιοχές που σχετίζονται με την υποστήριξη της τελομεράσης (43). Η συσχέτιση του μελανώματος με γενετικούς τόπους που έχουν συσχετιστεί με την τελομεράση ενδέχεται να είναι σημαντική για την κατανόηση της ανάπτυξης του μελανώματος.

Στο πεδίο του μελανώματος έχει ενδιαφέρον το γεγονός πως οι ισχυρά συσχετισμένοι γενετικοί παράγοντες κινδύνου που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα, δρουν μέσω των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.1.3.2 (43).

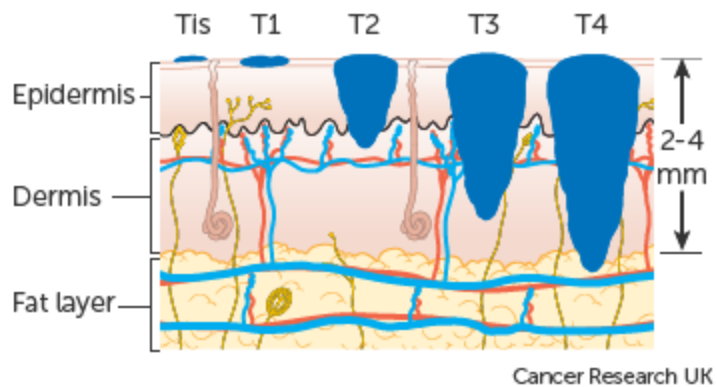
#### **1.1.4 Κλινική διάγνωση και πρόγνωση του μελανώματος**

Η κλινική διάγνωση και η χειρουργική αντιμετώπιση ασθενών με μελάνωμα, με τη βοήθεια κατευθυντήριων οδηγιών που έχουν αναπτυχθεί, έχουν φθάσει σε ένα σταθερά υψηλό επίπεδο στη Δυτική Ευρώπη, την Αυστραλία και τη Βόρεια Αμερική (45). Από την άλλη πλευρά, παρά την μεγάλη πρόοδο στην διάγνωση και χειρουργική αντιμετώπιση των ασθενών με μελάνωμα, το μεταστατικό μελάνωμα (στάδιο IV) εξακολουθεί να έχει κακή πρόγνωση και μέση διάρκεια επιβίωσης 6-12 μήνες. Μέχρι το 2010, καμία τυχαioποιημένη κλινική δοκιμή (RCT) δεν παρείχε στοιχεία για βελτίωση των προγνωστικών επιβίωσης για ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα προχωρημένου σταδίου. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια αρκετές τυχαioποιημένες κλινικές δοκιμές έδειξαν μια βελτίωση στην πρόγνωση επιβίωσης αυτών των ασθενών με τα αποτελέσματα να δείχνουν ένα προσδόκιμο ζωής από 2 έως 5 έτη (15).

Ο σημαντικότερος παράγοντας για την πρόγνωση της επιβίωσης για ασθενείς με μελάνωμα είναι το πάχος του όγκου βάση της κλίμακας Breslow. Η κλίμακα αυτή μετρά σε χιλιοστά (mm) το βάθος από την επιφάνεια του δέρματος, στο οποίο έχουν φτάσει τα κύτταρα του μελανώματος. Η επιβίωση μειώνεται με την αύξηση του δείκτη Breslow. Η κλίμακα Breslow ταξινομεί τους όγκους σε κατηγορίες με βάση το πάχος τους (Πηγή: <http://www.cancerresearchuk.org>).

- **Tis**: τα κύτταρα του μελανώματος βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος και μόνο
- **T1**: το μελάνωμα έχει πάχος μικρότερο από 1mm
- **T2**: το μελάνωμα έχει πάχος μεταξύ 1-2mm
- **T3** το μελάνωμα έχει πάχος μεταξύ 2-4mm
- **T4** το μελάνωμα έχει πάχος μεγαλύτερο από 4mm

Στον ανεπτυγμένο κόσμο η πλειονότητα των μελανωμάτων που διαγιγνώσκονται είναι πάχους <1 mm, κάτι που αποδεικνύει την αξία της έγκαιρης διάγνωσης (46).



Εικόνα 4. Στάδια πάχους του όγκου του μελανώματος.

Πηγή δεδομενων: Cancer Research UK, <https://www.cancerresearchuk.org/>



## 1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ

### 1.2.1 Γενετική επιδημιολογία και μελέτες γενετικής συσχέτισης

Γενετική επιδημιολογία είναι ο κλάδος της επιδημιολογίας που ασχολείται με την μελέτη των γενετικών χαρακτηριστικών των ανθρώπων σε σχέση με την ανάπτυξη και εξέλιξη ασθενειών και φαινοτύπων στο επίπεδο του πληθυσμού (47, 48).

Τα πρώτα ευρήματα της γενετικής επιδημιολογίας αφορούσαν μονογονιδιακά νοσήματα (49) και οι μελέτες γενετικής διασύνδεσης (genetic linkage studies) (50) είχαν σημαντικό ρόλο στην χαρτογράφηση αυτών των νοσημάτων (51). Στις μέρες μας όμως, έχει διαπιστωθεί πως τα περισσότερα νοσήματα είναι σύνθετα, δηλαδή τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη τους (πχ. καρκίνος, διαβήτης). Οι μελέτες γενετικής διασύνδεσης απέτυχαν να ταυτοποιήσουν τη συσχέτιση γενετικών παραγόντων με σύνθετα νοσήματα (52) και για το λόγο αυτό αντικαταστήθηκαν από τις μελέτες γενετικής συσχέτισης (genetic association studies) (53-55).

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης εξετάζουν τη συσχέτιση μεταξύ μιας νόσου και μιας γενετικής παραλλαγής για να εντοπίσουν υποψήφια γονίδια ή περιοχές γονιδιώματος που συμβάλλουν στην εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου. Οι μελέτες αυτές εξετάζουν αν υπάρχει υψηλότερη συχνότητα ενός πολυμορφισμού (SNP), αλληλομόρφου ή γονότυπου σε άτομα τα οποία έχουν τη νόσο που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Από μεθοδολογικής πλευράς, ο πιο απλός επιδημιολογικός σχεδιασμός για τον έλεγχο της παραπάνω υπόθεσης είναι μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων (case-control study). Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι γενετικοί δείκτες είναι οι πολυμορφισμοί (SNPs) λόγω του μεγάλου αριθμού τους στο γονιδίωμα. Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με σύνθετες ασθένειες (56).

### 1.2.2 Μελέτες υποψήφιων γονιδίων

Οι σημαντικότερες κατηγορίες μελετών γενετικών συσχετίσεων όσο αφορά τα σύνθετα νοσήματα είναι οι μελέτες υποψήφιων γονιδίων (candidate-gene association studies) και οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS). Οι μελέτες των υποψήφιων γονιδίων εξετάζουν συσχετίσεις μεταξύ φαινοτύπων και πολυμορφισμών σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους (57), η επιλογή των οποίων βασίζεται σε παλαιότερες μελέτες που έχουν δείξει μια πιθανή βιολογική-παθοφυσιολογική συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων αυτών με τον συγκεκριμένο φαινότυπο (58).

Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να ανακαλυφθούν γενετικοί τόποι που να σχετίζονται με την ανάπτυξη μελανώματος με τη χρήση μελετών υποψήφιας γονιδίων (31). Με την ανακάλυψη όμως νέων τεχνολογιών υψηλότερης απόδοσης, οι μελέτες υποψήφιας γονιδίων αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τις μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS).

### 1.2.3 Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος

Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) διερευνούν ταυτόχρονα εκατομμύρια πολυμορφισμούς, χρησιμοποιώντας μια αγνωστικιστική προσέγγιση σε όλο το γονιδίωμα, και αξιολογούν τις πιθανές συσχετίσεις αυτών των πολυμορφισμών με διάφορες σύνθετες ασθένειες (59). Το επίπεδο σημαντικότητας στις GWAS είναι το  $P=5 \times 10^{-8}$ , αρκετά αυστηρότερο σε σχέση με το κλασικό όριο στατιστικής σημαντικότητας  $P=0.05$ . Αυτό συμβαίνει γιατί στις GWAS πραγματοποιούνται συγχρόνως εκατομμύρια παράλληλοι έλεγχοι υποθέσεων. Τα σημαντικότερα ευρήματα μιας τέτοιας μελέτης, οι ερευνητές προσπαθούν να τα επικυρώσουν σε ανεξάρτητους πληθυσμούς. Οι GWAS τα τελευταία χρόνια έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη χιλιάδων γενετικών τόπων που συνδέονται με σύνθετες ασθένειες, παρόλα αυτά για τις περισσότερες από αυτές τις ασθένειες οι γενετικοί αυτοί τόποι εξηγούν ένα μικρό μόνο μέρος της μεταβλητότητας του κινδύνου τους (60). Με την πάροδο όμως των ετών και με τη χρήση όλο και νεότερων τεχνολογιών στην εισαγωγή, καταγραφή και αλληλούχιση γενετικών δεδομένων, αναμένεται να εντοπιστούν ακόμα περισσότερα γενετικά σήματα με τις GWAS. Η συνεχής εξέλιξη των GWAS για το μελάνωμα οδηγεί σε βαθύτερη κατανόηση των αιτιών ανάπτυξής του καθώς και σε καλύτερη πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισής του.

Οι GWAS δεν κάνουν κάποια εκ των προτέρων υπόθεση για τη θέση ή τη λειτουργία των υπεύθυνων πολυμορφισμών, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να ξεπεραστούν οποιαδήποτε προβλήματα δημιουργούνται από την ελλιπή κατανόηση της παθοφυσιολογίας διάφορων νοσημάτων (59). Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπίσει πάνω από 10,000 ισχυρές συσχετίσεις γενετικών τόπων με σύνθετα νοσήματα (61, 62). Παρόλα τα επιτεύγματα των GWAS, τα σύνθετα νοσήματα έχουν πολύπλοκη αρχιτεκτονική και κάθε πολυμορφισμός που σχετίζεται με αυτά έχει μια αρκετά μικρή συνεισφορά στον συνολικό κίνδυνο. Αυτός είναι ο λόγος που γίνεται προσπάθεια σύνθεσης των επιμέρους GWAS ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ισχύς για το εκάστοτε ερευνητικό ερώτημα (63). Η σύνθεση των επιμέρους GWAS γίνεται με τη μέθοδο της μετα-ανάλυσης, αυξάνοντας την ισχύ και

μειώνοντας τα ψευδώς θετικά σήματα (64). Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης έχει τεχνικές με τις οποίες μπορεί να εξαλείψει και την όποια ετερογένεια εμφανίζεται από τη σύνθεση διαφορετικών και ανομοιογενών δεδομένων και πληθυσμών (65, 66). Η μεγαλύτερη μετα-ανάλυση σε GWAS μελέτες πραγματοποιήθηκε για την αρτηριακή πίεση και περιελάμβανε σχεδόν 1 εκατομμύριο άτομα (67).

Οι GWAS χρειάζονται πολύ μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος σε σχέση με τις μελέτες της κλασικής επιδημιολογίας ώστε να επιτύχουν επαρκή ισχύ (68-72). Ένα μεγάλο μέγεθος δείγματος με επαρκή ισχύ είναι μείζονος σημασίας ώστε οι GWAS να ανακαλύψουν γενετικούς τόπους που σχετίζονται με σύνθετα νοσήματα (73). Η ανάγκη ύπαρξης μεγάλου όγκου δεδομένων και μεγάλου δείγματος ώθησε τους ερευνητές στη δημιουργία συνασπισμών ώστε να αυξηθεί το δείγμα και η ισχύς των αποτελεσμάτων. Παραδείγματα τέτοιων συνασπισμών είναι ο συνασπισμός GEFOS (GEnetic Factors of Osteoporosis) που έχει σαν σκοπό να εντοπίσει γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την οστεοπόρωση και τα κατάγματα ([www.gefos.org](http://www.gefos.org)) και ο συνασπισμός GIANT που εξέτασε τις συσχετίσεις πολυμορφισμών με ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά σε ένα σύνολο ~340,000 ατόμων (74). Στο πεδίο του μελανώματος έχει δημιουργηθεί ένας μεγάλος παγκόσμιος συνασπισμός με σκοπό την ανταλλαγή και τη συγκέντρωση όλων των δεδομένων από τις GWAS μελέτες και μετά-αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί. Ο συνασπισμός αυτός ονομάζεται The Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL; [www.genomel.org](http://www.genomel.org)).

#### **1.2.4 Παράδειγμα μελέτης σάρωσης γονιδιώματος μεγάλου μεγέθους δείγματος**

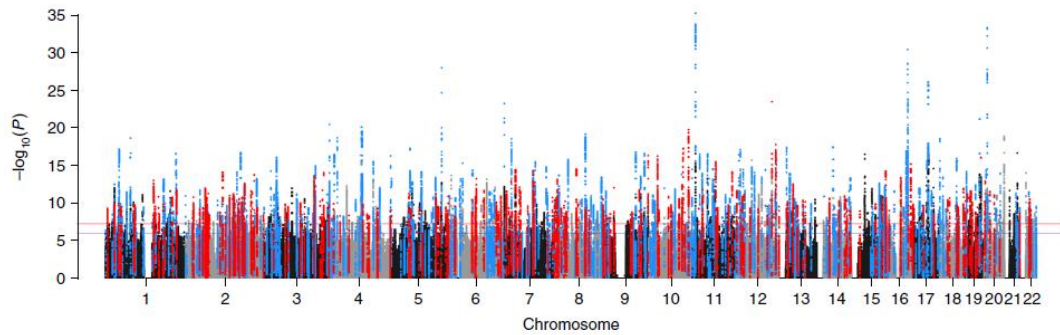
Η μεγαλύτερη GWAS που έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα για έκβαση σχετική με την υγεία περιελάμβανε σχεδόν ένα εκατομμύριο άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής και είχε σαν στόχο να ανακαλύψει νέους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την αρτηριακή πίεση (67). Οι ερευνητές σε αυτή τη μελέτη συνέθεσαν πληθυσμούς ευρωπαϊκής καταγωγής από τη βιοτράπεζα της UK Biobank, μια προοπτική μελέτη κοορτής ~500,000 συμμετεχόντων ηλικίας 40-69 ετών με εκτεταμένες φαινοτυπικές μετρήσεις και ιατρικά αρχεία (75), και από τον συνασπισμό ICBP (International Consortium of Blood Pressure) (76, 77) ~300,000 συμμετεχόντων, για να διερευνήσουν την συσχέτιση κοινών και χαμηλής συχνότητας πολυμορφισμών (Συχνότητα Ελλάσσονος Αλληλομόρφου (ΣΕΑ)  $\geq 1\%$ ) με την αρτηριακή πίεση. Πολυμορφισμοί που κατέδειξαν σημαντικές συσχετίσεις σε επίπεδο  $P < 1 \times 10^{-6}$  ( $n=1,062$ ) στη μετα-ανάλυση των δύο αυτών πληθυσμών, επιλέχθηκαν για

επικύρωση σε δύο ανεξάρτητους πληθυσμούς απο τις ΗΠΑ (US Million Veteran Program (MVP,  $N=220,520$ ) (78)) και την Εσθονία (Estonian Genome Centre, University of Tartu (EGCUT,  $N=28,742$ ) Biobank (79)). Για να θεωρηθεί επικυρωμένος ένας πολυμορφισμός θα έπρεπε να επιτύχει σημαντικότητα σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο  $P < 5 \times 10^{-8}$  στη συνδυασμένη μετα-ανάλυση των πληθυσμών ανακάλυψης και επικύρωσης καθώς και σημαντικότητα  $P < 0.01$  στη μετα-ανάλυση των πληθυσμών επικύρωσης (MVP και EGCUT). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης κατέληξαν στην ανακάλυψη 325 νέων ανεξάρτητων γενετικών τόπων καθώς και στην επικύρωση 92 γενετικών τόπων που είχαν ανακαλυφθεί παλιότερα, αλλά δεν είχαν επικυρωθεί (80).

Οι ερευνητές εκτός από την ανάλυση δύο-σταδίων που περιγράφηκε, πραγματοποίησαν και μια ανάλυση ενός-σταδίου, ώστε να μειωθεί το σφάλμα τύπου II που προκύπτει από τον παραπάνω τύπο ανάλυσης. Χρησιμοποιήθηκε αυστηρότερο όριο στην μετα-ανάλυση των πληθυσμών ανακάλυψης ( $P < 5 \times 10^{-9}$ ) και για τους πολυμορφισμούς που πέρασαν αυτό το όριο σημαντικότητας απαιτήθηκε εσωτερική επικύρωση σε όριο  $P < 0.01$  χωριστά σε κάθε έναν από τους δύο πληθυσμούς ανακάλυψης (UK Biobank και ICBP). Η μέθοδος της ανάλυσης ενός-σταδίου ανακάλυψη επιπλέον 210 νέους γενετικούς τόπους.

Συνολικά η GWAS των Evangelou et al., κατάφερε να ανακαλύψει 535 νέους γενετικούς που σχετίζονται με την αρτηριακή πίεση (67). Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται οι τιμές  $P$  από τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με την αρτηριακή πίεση κατά το στάδιο της ανακάλυψης, σε ένα διάγραμμα Manhattan. Τα διαγράμματα Manhattan είναι διαγράμματα σημείων που χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στις GWAS για την γραφική αναπαράσταση συσχετίσεων μεταξύ πολυμορφισμών και νοσημάτων, σε δεδομένα μεγάλου όγκου.





**Εικόνα 5. Γράφημα Manhattan της μεγαλύτερης έως σήμερα GWAS.**

Το γράφημα απεικονίζει την τιμή P της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την αρτηριακή πίεση στο στάδιο της ανακάλυψης (67).

Η GWAS αυτή με συνολικό πληθυσμό πάνω από ένα εκατομμύριο προσέφερε ένα σημαντικό βήμα προόδου στην κατανόηση της γενετικής αρχιτεκτονικής της αρτηριακής πίεσης. Οι 535 νέοι γενετικοί τόποι που συσχετίστηκαν με την αρτηριακή πίεση υπερτριπλασιάσαν τον αριθμό των γενετικών τόπων που προυπήρχαν και διπλασιάσαν την ποσοστιαία μεταβλητότητα που εξηγείται, κάτι που απεικονίζει τα οφέλη των βιοβάσεων μεγάλης κλίμακας.

### **1.2.5 Χρησιμότητα των μελετών σάρωσης γονιδιώματος στην ιατρική πράξη για το μελάνωμα**

Είναι προφανές πως η κατανόηση της γενετικής του μελανώματος μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του. Η εύρεση γονιδίων και γενετικών τόπων που σχετίζονται με το μελάνωμα, επιτρέπει την αξιολόγηση των ασθενών βάση του γενετικού τους προφίλ και ενισχύει τις πρακτικές ιατρικής ακριβείας με στόχο την πρόληψη και πρόγνωση του κινδύνου του μελανώματος. Πολλές φορές όμως, οι GWAS από μόνες τους δεν αρκούν καθώς τα γενετικά σήματα που ανακαλύπτουν δεν εντοπίζουν πάντα τους πραγματικά αιτιώδεις πολυμορφισμούς που ευθύνονται για την εξεταζόμενη νόσο, αλλά γειτονικά. Για την εύρεση των αιτιωδών πολυμορφισμών καθώς και των αντίστοιχων γονιδίων χρειάζεται ο συνδυασμός στατιστικής και βιοπληροφορικής ώστε να εντοπιστούν παθοφυσιολογικά μονοπάτια και βιολογικές πληροφορίες για την εξεταζόμενη νόσο (81, 82).

### 1.2.6 Αποτελέσματα από τις μελέτες σάρωσης γονιδιώματος για το μελάνωμα έως τώρα

Αρκετές GWAS για το μελάνωμα έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, οι οποίες έχουν ανακαλύψει 20 γονίδια που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωμιακής σημαντικότητας  $P < 5 \times 10^{-8}$ . Αρχικά οι GWAS είχαν ανακαλύψει 13 γονίδια που σχετίζονταν με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωμιακής σημαντικότητας  $P < 5 \times 10^{-8}$  (83-88), πολλά από τα οποία συσχετιζόνταν και με φαινότυπους στενά συνδεδεμένους με τον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος, όπως τα MC1R, ASIP, TYR, SLC45A2 που σχετίζονται και με την μελάγχρωση και τα CDKN2A-MTAP, PLA2G6, TERT που σχετίζονται με τον αριθμό των σπίλων. Γονίδια που ανακαλύφθηκαν από τις GWAS του μελανώματος, συνδέονται και με την επιδιόρθωση του DNA (PARP1, ATM).

Στην μεγαλύτερη GWAS μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για το μελάνωμα, συμμετείχαν 15,990 ασθενείς με μελάνωμα και 26,409 υγιείς μάρτυρες Ευρωπαϊκής καταγωγής (44). Η μελέτη αυτή του 2015 από τους Law et al., επικύρωσε τους 13 γενετικούς τόπους που είχαν ανακαλυφθεί έως τότε, ανακάλυψε 5 νέους και επικύρωσε ακόμα 2 οι οποίοι είχαν καταγραφεί αλλά δεν είχαν επικυρωθεί. Από τα νέα γονίδια που ανακαλύφθηκαν, κάποια έχουν συσχετιστεί και με άλλους καρκίνους, όπως καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (AGR3), ενώ άλλα με την υποστήριξη της τελομεράσης (OBFC1), κάτι που είχαν δείξει και πρότερα ανακαλυφθέντα γονίδια (TERT-CLPTM1L, PARP1 και ATM). Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται οι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με το μελάνωμα σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωμιακής σημαντικότητας  $P < 5 \times 10^{-8}$  από GWAS. Είναι άξιο αναφοράς το γεγονός πως οι 5 νέοι γενετικοί τόποι που ανακαλύφθηκαν από την μεγαλύτερη έως τώρα GWAS δεν έχουν ποτέ συσχετιστεί με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της μελάγχρωσης για το μελάνωμα. Το γεγονός αυτό ίσως ανοίγει νέους ορίζοντες για την κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου του μελανώματος και τονίζει τη σημασία των μεγάλων δειγμάτων στις GWAS μελέτες.

Ένα σημαντικό πρόβλημα των GWAS για το μελάνωμα μέχρι σήμερα είναι η έλλειψη στατιστικής ισχύος για τον εντοπισμό μεγάλου αριθμού στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων, λόγω των μικρών μεγεθών επίδρασης που παρουσιάζουν τα υποψήφια γονίδια και οι γενετικοί τόποι. Το ίδιο πρόβλημα ισχύει και για τον εντοπισμό πολυμορφισμών με χαμηλή συχνότητα ελλάσσονος αλληλομόρφου (ΣΕΑ) ( $0.01 < \text{ΣΕΑ} < 0.05$ ) και σπάνιων πολυμορφισμών ( $\text{ΣΕΑ} < 0.01$ ), οι οποίοι στο πεδίο του μελανώματος δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς ή συνήθως απορρίπτονται από επιπλέον ανάλυση σε αρχικά στάδια των GWAS. Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών που έχουν ανακαλυφθεί να σχετίζονται με το

μελάνωμα σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας είναι κοινοί πολυμορφισμοί ( $SEA > 0.05$ ) και το εύρος της συχνότητας του ελλάσσονος αλληλομόρφου κυμαίνεται μεταξύ 0.08 και 0.47, εκτός από τον πολυμορφισμό rs250417 που βρίσκεται στο γονίδιο SLC45A2 και έχει  $SEA = 0.03$ . Αποδείχθηκε πως ακόμα και στην μεγαλύτερη GWAS για μελάνωμα που έχει γίνει έως σήμερα (44), δεν υπήρχε αρκετή ισχύς ώστε να εντοπιστούν πολυμορφισμοί χαμηλής συχνότητας ( $SEA < 0.05$ ) ακόμα και αν έχουμε μετρίου μεγέθους μεγέθη επιδράσεων. Μελλοντικές GWAS με ακόμα μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος ίσως είναι ικανές να ανακαλύψουν πολυμορφισμούς με παρόμοια μεγέθη επίδρασης με αυτούς που έχουν βρεθεί έως τώρα, αλλά με χαμηλότερη  $SEA$  (43).

**Πίνακας 3. Γενετικοί τόποι που σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος**

Πολυμορφισμός	Γενετική περιοχή	Γονίδιο	Συχνότητα ελλάσσονος αλληλομόρφου ( $SEA$ )	$P$ τιμή	Λειτουργικότητα
rs12410869	1q21.3	ARNT/SETDB1	0.37	$5.2 \times 10^{-13}$	Άγνωστη
rs1858550	1q42.12	PARP1	0.34	$1.7 \times 10^{-13}$	Επιδιόρθωση DNA / Υποστήριξη τελομεράσης
rs6750047 <sup>1</sup>	2p22.2	RMDN2 (CYP1B1)	0.43	$7 \times 10^{-9}$	Άγνωστη
rs7582362	2q33-q34	CASP8	0.27	$8.9 \times 10^{-9}$	Απόπτωση
rs380286	5p15.33	TERT/CLPTM1L	0.44	$1.6 \times 10^{-17}$	Αριθμός σπίλων / Υποστήριξη τελομεράσης
rs250417	5p13.2	SLC45A2	0.03	$2.3 \times 10^{-12}$	Μελάγχρωση
rs6914598 <sup>1</sup>	6p22.3	CDKAL1	0.32	$3.5 \times 10^{-8}$	Ρυθμιστής γονιδιακής έκφρασης
rs1636744 <sup>1</sup>	7p21.1	AGR3	0.40	$7.1 \times 10^{-9}$	Διαγονιδιακοί γενετικοί τόποι
rs7852450	9p21	CDKN2A/MTAP	0.48	$4.6 \times 10^{-32}$	Αριθμός σπίλων

rs10739221 <sup>1</sup>	9q31.2	TMEM38B (RAD23B, TAL2)	0.24	$7.1 \times 10^{-11}$	Διαγονιδιακοί γενετικοί τόποι
rs2995264 <sup>1</sup>	10q24.33	OBFC1	0.09	$2.2 \times 10^{-9}$	Υποστήριξη τελομεράσης
rs498136 <sup>2</sup>	11q13.3	CCND1	0.32	$1.5 \times 10^{-12}$	Άγνωστη
rs1393350	11q14-q21	TYR	0.27	$2.5 \times 10^{-25}$	Μελάγχρωση
rs73008229	11q22-q23	ATM	0.14	$1.4 \times 10^{-12}$	Επιδιόρθωση DNA / Υποστήριξη τελομεράσης
rs4778138 <sup>2</sup>	15q13.1	OCA2	0.16	$2.2 \times 10^{-11}$	Μελάγχρωση
rs12596638	16q12.2	FTO	0.16	$1.8 \times 10^{-9}$	Μεταβολισμός
rs75570604	16q24.3	MC1R	0.08	$6.2 \times 10^{-92}$	Μελάγχρωση
rs6088372	20q11.2-q12	ASIP	0.14	$3.4 \times 10^{-25}$	Μελάγχρωση
rs408825	21q22.3	MX2	0.40	$3.2 \times 10^{-15}$	Άγνωστη
rs2092180	22q13.1	PLA2G6	0.47	$2.1 \times 10^{-11}$	Αριθμός σπύλων
<sup>1</sup> Νέοι γενετικοί τόποι που ανακαλύφθηκαν απο τη μελέτη Law et al., 2015 (44) <sup>2</sup> Γενετικοί τόποι που είχαν καταγραφεί, αλλά δεν είχαν επικυρωθεί έως τώρα και επικυρώθηκαν απο μελέτη Law et a, 2015 (44)					

### 1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση γενετικών παραγόντων που έχουν ανακαλυφθεί να σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ( $P < 0.05$ ) σε έναν ανεξάρτητο ελληνικό πληθυσμό ώστε να επικυρωθεί η σημαντικότητα τους. Ο ελληνικός πληθυσμός έχει έντονο ενδιαφέρον καθώς έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης μελανώματος παρά τον υψηλό βαθμό έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (89). Επιπλέον αξιολογήθηκε η προβλεπτική ικανότητα των γενετικών αυτών παραγόντων, με τη κατασκευή ενός γενετικού δείκτη κινδύνου, για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Με τον τρόπο εξετάστηκε αν με την προσθήκη κοινών πολυμορφισμών σε ένα φαινοτυπικό μοντέλο πρόβλεψης αυξάνεται η διακριτική του ικανότητα.

Στη συνέχεια της παρούσας διατριβής έγινε προσπάθεια να ανακαλυφθούν νέοι γενετικοί τόποι που επιδρούν στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, αξιολογώντας την ήδη υπάρχουσα πληροφορία. Για την εκτίμηση της επίδρασης των υποψήφιων γενετικών πολυμορφισμών στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη GWAS για το μελάνωμα που έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα (44). Τα πιο ελπιδοφόρα γενετικά σήματα επικυρώθηκαν σε τρεις ανεξάρτητους πληθυσμούς. Την βιοτράπεζα UK Biobank (75), τον ελληνικό πληθυσμό που προαναφέρθηκε και έναν πολύ καλά γονοτυπημένο πληθυσμό ασθενών-μαρτύρων από την Κύπρο. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της αρχικής GWAS με τους τρεις πληθυσμούς επικύρωσης, συντέθηκαν με τη χρήση της μεθόδου της μετα-ανάλυσης, με σκοπό να ανδειχθούν νέοι γενετικοί τόποι που επιδρούν στην ανάπτυξη του μελανώματος.

Στο επόμενο σκέλος της παρούσας διατριβής εξετάστηκε κατά πόσο η υψηλή γενετική προδιάθεση μπορεί να τροποποιηθεί μέσω ενός ευνοϊκού/προστατευτικού τρόπου ζωής, με άλλα λόγια κατά πόσο ο γενετικός κίνδυνος μειώνεται όταν το άτομο υιοθετεί σωστές πρακτικές για την προφύλαξη ανάπτυξης μελανώματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τους ήδη γνωστούς γενετικούς πολυμορφισμούς που επιδρούν ισχυρά στον κίνδυνο μελανώματος, κατασκευάστηκε ένας σταθμισμένος γενετικός δείκτης κινδύνου και εξετάστηκε κατά πόσο ένας αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος, λόγω γενετικής προδιάθεσης μπορεί να ελαττωθεί από την μειωμένη έκθεση στον ήλιο. Πραγματοποιήθηκε διαστρωμάτωση του πληθυσμού σε υψηλό και χαμηλό κίνδυνο με βάση το γενετικό δείκτη κινδύνου και εξετάστηκε αν η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία τροποποιεί τον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος σε άτομα με υψηλή γενετική προδιάθεση.

Τέλος, διερευνήθηκε η αιτιώδης σχέση επιλεγμένων παραγόντων κινδύνου με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, με τη χρήση γενετικής πληροφορίας. Για τη διερεύνηση αυτής της συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Μεντελιανής τυχαιοποίησης. Η Μεντελιανή τυχαιοποίηση είναι ένας επιδημιολογικός σχεδιασμός που ενσωματώνει υπάρχουσα γενετική πληροφορία για τον έλεγχο της αιτιώδους σχέσης μεταξύ μιας έκθεσης και μιας έκβασης, όταν θεωρείται ότι υπάρχουν συγχυτικοί παράγοντες που δεν μπορούν να εντοπιστούν πλήρως (90). Αναζητήθηκαν αιτιώδεις σχέσεις με επιλεγμένους παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος από μελέτες παρατηρήσεις, όπως η κατανάλωση καφέ, η συγκέντρωση βιταμίνης D και η λήψη ρετινόλης και β-καροτένης στον οργανισμό με απώτερο στόχο την αποκρυπτογράφηση των παραγόντων που επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΕΝΑΝ ΝΟΤΙΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΕ ΕΝΑ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΙΚΤΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

#### 2.1.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Η ανάπτυξη του μελανώματος είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών, φαινοτυπικών και γενετικών παραγόντων κινδύνου. Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) έχουν ανακαλύψει πολυάριθμους γενετικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Η μεγαλύτερη GWAS για το μελάνωμα επικύρωσε τους 13 πολυμορφισμούς που είχαν ανακαλυφθεί παλιότερα, ανακάλυψε 5 νέους και επικύρωσε ακόμα 2 οι οποίοι είχαν καταγραφεί αλλά δεν είχαν επικυρωθεί (44). Τα ευρήματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση του μελανώματος με γονίδια που σχετίζονται με τη μελάγχρωση (MC1R, TYR, SLC45A2) και τον αριθμό σπύλων (MTAP, PLA2G6), καθώς και με γενετικούς τόπους που εμπλέκονται στην απόπτωση (CASP8), στην επισκευή του DNA (PARP-1, ATM), στον μεταβολισμό (FTO) και στην υποστήριξη της τελομεράσης (TERT / CLPTM1L) (84, 87, 91).

Αυτός ο αυξανόμενος κατάλογος γενετικών τόπων που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος χρειάζεται επικύρωση σε μεγάλα ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων από άλλους πληθυσμούς. Κάτω από αυτό το πρίσμα, ο ελληνικός πληθυσμός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι έχει χαμηλή επίπτωση μελανώματος σε σύγκριση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες παρά τον υψηλό βαθμό έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία των κατοίκων του κατά τη διάρκεια του έτους (89).

Σκοπός της μελέτης ήταν η επικύρωση ενός εκτεταμένου συνόλου πολυμορφισμών που είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, σε ένα ανεξάρτητο δείγμα ασθενών με μελάνωμα και υγείων μαρτύρων από την Ελλάδα. Επιπλέον, αξιολογήθηκε ο συνολικός αντίκτυπος των πολυμορφισμών στην πρόβλεψη του κινδύνου μελανώματος με τον υπολογισμό ενός σταθμισμένου γενετικού δείκτη κινδύνου (ΓΔΚ) ο οποίος συνδυάστηκε με τους φαινοτυπικούς παράγοντες κινδύνου.

## 2.1.2 Μέθοδοι

### Πληθυσμός Μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης περιελάμβανε ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση μελανώματος από το Νοσοκομείο Α. Συγγρός στην Αθήνα και ένα συνεργαζόμενο ογκολογικό κέντρο (Νοσοκομείο Λαϊκό, Ογκολογική Κλινική) από το 2000 έως το 2014. Στα δύο αυτά κέντρα οι πλειοψηφία των ασθενών με μελανώμα ήταν από την Αθήνα, παρέχοντας έτσι ένα αντιπροσωπευτικό μέγεθος δείγματος του ελληνικού πληθυσμού.

Στην ομάδα των μαρτύρων συμμετείχαν αιμοδότες από ένα κέντρο αιμοδοσίας της Αθήνας και άτομα με μικρές δερματικές παθήσεις, αλλά χωρίς ιστορικό κακοήθειας του δέρματος, οι οποίοι παρακολουθούνταν από τα εξωτερικά ιατρεία ασθενών του νοσοκομείου Α. Συγγρός. Όλα τα άτομα ήταν άνω των 18 ετών. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, τα χαρακτηριστικά μελάγχρωσης (οφθαλμός, μαλλιά και χρώμα δέρματος), ο φωτότυπος του δέρματος, η ικανότητα μαυρίσματος και πληροφορίες από κλινική εξέταση λήφθηκαν μέσω ερωτηματολογίου που συμπληρώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες υπό την επίβλεψη πιστοποιημένου δερματολόγου που πραγματοποίησε την κλινική εξέταση. Η διαδικασία αυτή διεξήχθη τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους μάρτυρες. Το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από την Επιστημονική και Ηθική Επιτροπή του Νοσοκομείου Α. Συγγρός και όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν γραπτή συγκατάθεση πριν από τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Το ποσοστό συμμετοχής ήταν περίπου 95% για τους ασθενείς και 90% για τους μάρτυρες.

### Επιλογή Πολυμορφισμών

Πενήντα εννέα πολυμορφισμοί που είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος γονοτυπήθηκαν. Οι περισσότεροι από αυτούς τους πολυμορφισμούς (n=52) επιλέχθηκαν από την MelGene ([www.melgene.org](http://www.melgene.org)), μια συνεχώς ενημερωμένη βάση δεδομένων για μελέτες γενετικής συσχέτισης σχετικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (31, 92, 93). Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν και 7 πολυμορφισμοί που είχαν στατιστικά σημαντική σχέση σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στην μεγαλύτερη GWAS



μελέτη (44) και εξετάστηκαν στον ελληνικό πληθυσμό στο πλαίσιο της επικύρωσης. Όσοι πολυμορφισμοί συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη μας και επιλέχθηκαν από την MelGene, έπρεπε να έχουν  $P < 0.05$  στη συσχέτιση τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος και ισχυρή ένδειξη αξιοπιστίας βάση των κριτηρίων του Venice (94), ενώ όσοι επιλέχθηκαν από την GWAS έπρεπε να σχετίζονται σημαντικά σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν και επιπλέον 13 πολυμορφισμοί από τη βάση MelGene λόγω της ισχυρής βιολογικής τους συσχέτισης με παθοφυσιολογικά μονοπάτια που συνδέονται με το μελάνωμα, ακόμη και αν δεν πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια.

### **Απομόνωση DNA, γονοτύπηση και έλεγχος ποιότητας**

Η γονοτύπηση των δειγμάτων DNA έγινε χρησιμοποιώντας την Sequenom iPLEX (Sequenom, Hamburg, Germany) (95). Τα κριτήρια ελέγχου ποιότητας περιελάμβαναν την συμπερίληψη των πολυμορφισμών με επιτυχία γονοτύπησης  $\geq 97\%$  και χωρίς απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg ( $P < 5 \times 10^{-3}$ ). Αποκλείστηκαν επίσης οι συμμετέχοντες με απόδοση γονότυπου  $< 90\%$ .

### **Στατιστική Ανάλυση**

Η συσχέτιση κάθε πολυμορφισμού με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος έγινε με τη χρήση μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης, υποθέτωντας ένα αθροιστικό μοντέλο. Για την διόρθωση πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bonferroni. Για την διόρθωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο αρχικός αριθμός των υπό εξέταση πολυμορφισμών ( $n=59$ ) και όχι ο αριθμός των πολυμορφισμών που τελικά αναλύθηκαν ( $n=53$ ). Η τιμή που τέθηκε σαν όριο ήταν η  $P < 8.47 \times 10^{-4}$ . Επιπλέον εκτιμήθηκε (i) τη συσχέτιση των συχνοτήτων του αλληλομόρφου κινδύνου μεταξύ Ευρωπαίων από την πλατφόρμα 1000G (EUR, phase3 v5) και του ελληνικού πληθυσμού της μελέτης και (ii) η συσχέτιση του μεγέθους επίδρασης που βρέθηκε στον ελληνικό πληθυσμό με αυτές που έχουν ήδη καταγραφεί. Οι συχνότητες ελάσσονος αλληλομόρφου από την πλατφόρμα 1000G, εξήχθησαν από το SNIPA (96), ένα εργαλείο για την επεξήγηση και την περιήγηση γενετικών πολυμορφισμών.

Τέλος, υπολογίστηκε η ανισορροπία διασύνδεσης (LD) χρησιμοποιώντας το εργαλείο PLINK 1.07 για τους πολυμορφισμούς που βρίσκονταν σε γειτονικούς γενετικούς

τόπους. Θεωρήθηκε ότι πολυμορφισμοί με τιμές  $r^2 < 0.6$  ήταν ανεξάρτητοι. Για την επιβεβαίωση της ανεξαρτησίας, πραγματοποιήθηκε και υπό όρους ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης (conditional logistic regression) για τα ζεύγη πολυμορφισμών με  $0.3 < r^2 < 1$ .

### Υπολογισμός Ισχύος

Η πλατφόρμα QUANTO χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς της ισχύος ([http:// biostats.usc.edu/Quanto.html](http://biostats.usc.edu/Quanto.html)). Για κάθε πολυμορφισμό, η ισχύς για τον εντοπισμό επιδράσεων σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$  υπολογίστηκε με βάση την παρατηρούμενη συχνότητα ελλάσσονος αλληλομόρφου (ΣΕΑ) στο δείγμα μας από τον ελληνικό πληθυσμό, το μέγεθος του δείγματος μας, τον Λόγο Αναλογιών (ΛΑ) από την μελέτη που προήλθε κάθε πολυμορφισμός και τον επιπολασμό του μελανώματος στον ελληνικό πληθυσμό (πηγή: Globocan) (89), υποθέτοντας ένα αθροιστικό μοντέλο. Το σύνολο των εκτιμήσεων ισχύος αντιστοιχεί στον αριθμό των πολυμορφισμών που αναμένεται να επικυρωθούν.

### Υπολογισμός γενετικού δείκτη κινδύνου (ΓΔΚ) και πρόγνωση κινδύνου μελανώματος

Κατασκευάσαμε δύο σταθμισμένους ΓΔΚ. Ο πρωτεύων ΓΔΚ βασίστηκε στους πολυμορφισμούς εκείνους που συσχετίζονταν με τον κίνδυνο μελανώματος σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας (ΓΔΚ<sub>ΕΥΡ</sub>;  $n=26$ ), οι οποίοι προέρχονταν από την βάση της MelGene ( $n=12$ ), από την πρόσφατη μετα-ανάλυση του Law et al (44) ( $n=5$ ) ή από ανεξάρτητες GWAS μελέτες που δεν διέθεταν επαρκή σύνολα δεδομένων για να μετα-αναλυθούν στην MelGene ( $n=9$ ). Ο δευτερεύων ΓΔΚ βασίστηκε σε όλους τους πολυμορφισμούς που γονοτυπήθηκαν με επιτυχία και αναλύθηκαν (ΓΔΚ<sub>ΣΥΝ</sub>;  $n=53$  από το σύνολο των 59) (Πίνακας 4). Ο ΓΔΚ αντιπροσωπεύει ένα άθροισμα του αριθμού των αλληλομόρφων κινδύνου σταθμισμένο από τους εκτιμητές επίδρασής τους (εκτιμητές beta). Οι εκτιμητές αυτοί προήλθαν από τις ανεξάρτητες πηγές που περιγράφηκαν νωρίτερα (βλ. Πίνακα 4). Κάθε ΓΔΚ τυποποιήθηκε ανά μονάδα αύξησης στον πληθυσμό των μαρτύρων.

Για κάθε ΓΔΚ υπολογίστηκε η συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος προσαρμόζοντας την ανάλυση για το φύλο, την ηλικία και ένα σύνολο φαινοτυπικών παραγόντων κινδύνου όπως το χρώμα των ματιών, το χρώμα των μαλλιών, το χρώμα του

δέρματος, ο φωτοτύπος του δέρματος (σύμφωνα με την κλίμακα Fitzpatrick) και η ικανότητα μαυρίσματος. Στην περίπτωση που έλειπαν οι τιμές των προγνωστικών αυτών παραγόντων, δημιουργήθηκε μια μεταβλητή-δείκτης η οποία δήλωνε την έλλειψη τιμής και ενσωματώθηκε στο μοντέλο σαν ανεξάρτητη μεταβλητή. Επίσης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ευαισθησίας που περιλάμβαναν μόνο το φύλο, την ηλικία και τον ΓΔΚ, καθώς και μια ανάλυση που περιορίστηκε μόνο σε μεταβλητές με μη ελλείπουσες τιμές.

Αξιολογήθηκε επίσης η προγνωστική ικανότητα του ΓΔΚ υπολογίζοντας την «περιοχή κάτωθι της καμπύλης» (ΠΚΚ) (area under the receiver operating characteristic curve, AUC). Η ΠΚΚ υπολογίστηκε βάση των μεταβλητών που αναφέρθηκαν παραπάνω και με την προσθήκη του ΓΔΚ, αλλά και χωρίς την προσθήκη αυτού. Η μέθοδος bootstrap ( $n=1,000$ ) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των  $P$  τιμών για την σύγκριση των ΠΚΚ. Προκειμένου να εκτιμηθεί η εσωτερική εγκυρότητα των προγνωστικών μοντέλων, υπολογίστηκε το μέσο τετραγωνικό σφάλμα ρίζας, το οποίο αντιπροσωπεύει τις διαφορές μεταξύ των προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών, σε διαιρεμένες ανά 5 επικυρώσεις με 1,000 επαναλήψεις. Οι μικρές τιμές δηλώνουν καλή επικύρωση. Η βαθμονόμηση του μοντέλου εκτιμήθηκε επίσης με τον υπολογισμό της κατανομής των αναμενόμενων τιμών και τη σύγκρισή τους με τις παρατηρούμενες τιμές χρησιμοποιώντας το Hosmer-Lemeshow test.

Τέλος, δημιουργήθηκαν πεμπτημόρια του ΓΔΚ και υπολογίστηκαν οι εκτιμητές ΛΑ για τις 5 αυτές κατηγορίες χρησιμοποιώντας την μεσαία σαν κατηγορία αναφοράς. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε διαστρωμάτωση του συνόλου των δεδομένων σε τεταρτημόρια ηλικίας (δηλ. την ηλικία κατά την εμφάνιση του μελανώματος για τους ασθενείς και την ηλικία κατά την εξέταση για τους μάρτυρες) και υπολογίστηκαν οι εκτιμητές ΛΑ του ΓΔΚ για κάθε ηλικιακή ομάδα.

Πίνακας 4. Τοποθεσία στο γονιδίωμα, Πηγή απο την οποία προήλθαν και αποτελέσματα γονοτύπησης για τους 59 επιλεγμένους πολυμορφισμούς

Πολυμορφισμός	Χρωμόσωμα	Θέση	Πλησιέστερο Γονίδιο <sup>1</sup>	Ελλάσσον Αλληλόμορφο	ΣΕΑ	P τιμή	ΛΑ (95% ΔΕ)	ΛΑ προέλευσης/ Πηγή προέλευσης	
rs7412746 <sup>2</sup>	1	150860471	LOC100996521	T	0.4768	0.1618	0.905 (0.787, 1.041)	1.14	MacGregor et al., 2011
rs3219090	1	226564691	PARP1	A	0.3528	0.09918	0.883 (0.763, 1.024)	0.86	MelGene meta-analysis
rs3768080	1	236179869	NID1	G	0.4095	0.02578	1.174 (1.019, 1.351)	1.07	Nan et al., 2011
rs6750047 <sup>3</sup>	2	38276549	RMDN2	A	-	-	-	-	Law et al., 2015
rs10931936 <sup>2</sup>	2	202143928	CASP8	T	0.307	0.02993	1.180 (1.016, 1.370)	1.15	MelGene meta-analysis
rs1035142 <sup>2</sup>	2	202153078	(ALS2CR12 and CASP8)	T	0.4546	0.1466	1.109 (0.9644, 1.275)	1.14	MelGene meta-analysis
rs149617956 <sup>4</sup>	3	70014091	MITF						MelGene meta-analysis
rs13097028 <sup>5</sup>	3	169464942	(ACTRT3)	T	0.2895	0.4274	0.939 (0.805, 1.096)	0.89	Song et al., 2014
rs12696304	3	169481271	(TERC)	G	0.2707	0.3378	0.926 (0.790, 1.084)	0.91	Law et al., 2015
rs4698934 <sup>5</sup>	4	106139387	TET2	C	0.1335	0.4521	0.924 (0.751, 1.136)	0.85	Song et al., 2014
rs401681 <sup>2</sup>	5	1322087	CLPTM1L	T	0.4159	0.000223	1.302 (1.132, 1.498)	1.19	MelGene meta-analysis
rs16891982 <sup>2</sup>	5	33951693	SLC45A2	C	0.1355	3.8x10 <sup>-6</sup>	0.587 (0.467, 0.737)	0.42	MelGene meta-

									analysis
rs35390 <sup>5</sup>	5	33955326	SLC45A2	C	0.08908	0.003462	0.672 (0.515, 0.879)	0.36	Barrett et al., 2011
rs12203592 <sup>5</sup>	6	396321	IRF4	T	0.05451	0.4569	0.887 (0.648, 1.216)	1.16	MelGene meta- analysis
rs872071 <sup>5</sup>	6	411064	IRF4	G	0.4385	0.8636	1.012 (0.879, 1.165)	0.93	Barrett et al., 2011
rs6914598 <sup>2</sup>	6	21163919	CDKAL1	C	0.3331	0.6419	1.036 (0.894, 1.200)	1.10	Law et al., 2015
rs1636744 <sup>2</sup>	7	16984280	(AGR3)	A	0.3695	0.8981	1.009 (0.874, 1.166)	1.09	Law et al., 2015
rs1408799	9	12672097	(TYRP1)	T	0.3319	0.4665	1.056 (0.912, 1.224)	0.91	MelGene meta- analysis
rs4636294 <sup>2</sup>	9	21747804	MTAP	G	0.4044	0.03023	0.854 (0.739, 0.985)	0.83	MelGene meta- analysis
rs10757257 <sup>2</sup>	9	21806562	MTAP	A	0.2976	0.06139	0.863 (0.739, 1.007)	0.81	MelGene meta- analysis
rs7023329 <sup>2</sup>	9	21816528	MTAP	G	0.394	0.8437	0.986 (0.855, 1.137)	0.83	MelGene meta- analysis
rs3088440	9	21968159	CDKN2A	A	0.0801	0.515	1.087 (0.845, 1.397)	1.27	MelGene meta- analysis
rs11515 <sup>5</sup>	9	21968199	CDKN2A	G	0.1809	0.518	0.942 (0.784, 1.130)	1.05	MelGene meta- analysis
rs1011970 <sup>5</sup>	9	22062134	(CDKN2A)	T	0.1769	0.1826	1.129 (0.944, 1.351)	1.18	Maccioni et al., 2013

rs10739221 <sup>2</sup>	9	109060830	(TMEM38B, ZNF462, RAD23B)	T	0.271	0.01536	1.209 (1.037, 1.409)	1.13	Law et al., 2015
rs2995264 <sup>2</sup>	10	105668843	OBFC1	G	0.1179	0.2326	1.137 (0.921, 1.403)	1.17	Law et al., 2015
rs17119490 <sup>2</sup>	10	107522927	LOC101927549	A	0.01757	0.03287	1.668 (1.038, 2.683)	8.4	Teerlink et al., 2011
rs1485993 <sup>5</sup>	11	69362414	(CCND1)	T	0.4211	0.07393	1.137 (0.988, 1.308)	1.09	MelGene meta- analysis
rs1042602	11	88911696	TYR	A	0.4855	0.5016	1.049 (0.912, 1.206)	0.94	MelGene meta- analysis
rs1847142 <sup>2</sup>	11	89021574	TYR	A	0.2199	0.2166	1.110 (0.941, 1.310)	1.31	Bishop et al., 2009
rs1801516 <sup>2</sup>	11	108175462	ATM	A	0.1395	0.1383	0.856 (0.696, 1.052)	0.84	MelGene meta- analysis
rs1544410	12	48239835	VDR	A	0.4266	0.6725	0.970 (0.843, 1.117)	0.9	MelGene meta- analysis
rs17655	13	103528002	XPG	G	0.2748	0.2088	0.904 (0.772, 1.058)	0.91	MelGene meta- analysis
rs1800407 <sup>5</sup>	15	28230318	OCA2	A	0.06078	0.1572	1.223 (0.925, 1.616)	1.38	MelGene meta- analysis
rs4778138 <sup>2</sup>	15	28355820	OCA2	G	0.3698	0.01417	0.833 (0.719, 0.964)	0.84	Law et al., 2015

rs1129038 <sup>6</sup>	15	28356859	HERC2	A	-	-	-	-	Amos et al., 2011
rs12913832	15	28365618	HERC2	G	0.3676	0.000778	1.276 (1.107, 1.471)	1.11	Amos et al., 2011
rs16953002 <sup>3</sup>	16	54114824	FTO	A	-	-	-	-	Iles et al., 2013
rs7188458 <sup>2</sup>	16	89726484	C16orf55	A	0.3199	0.2367	1.094 (0.943, 1.268)	1.30	Bishop et al., 2009
rs12918773 <sup>2</sup>	16	89741403	(CDK10)	A	0.03082	1.6x10 <sup>-6</sup>	2.281 (1.615, 3.223)	1.87	Bishop et al., 2009
rs258322 <sup>3</sup>	16	89755903	CDK10	T	-	-	-	-	MelGene meta-analysis
rs1805005	16	89985844	MC1R	T	0.1414	0.002556	1.339 (1.107, 1.619)	1.14	MelGene meta-analysis
rs1805006 <sup>5</sup>	16	89985918	MC1R	A	0.003145	0.2556	0.399 (0.077, 2.058)	1.53	MelGene meta-analysis
rs2228479	16	89985940	MC1R	A	0.04255	0.1566	1.266 (0.913, 1.755)	1.08	MelGene meta-analysis
rs11547464 <sup>5</sup>	16	89986091	MC1R	A	0.008794	0.000104	3.133 (1.707, 5.750)	1.47	MelGene meta-analysis
rs1805007 <sup>2</sup>	16	89986117	MC1R	T	0.02453	8.2x10 <sup>-6</sup>	2.339 (1.594, 3.433)	1.8	MelGene meta-analysis
rs1805009 <sup>2</sup>	16	89986546	MC1R	C	0.001252	0.4138	2.003 (0.366, 10.95)	1.89	MelGene meta-analysis
rs4238833 <sup>2</sup>	16	90050689	AFG3L1	G	0.3218	0.2432	1.092 (0.942, 1.32)	1.32	Bishop et al., 2009

							1.266)		
rs4785763 <sup>2</sup>	16	90066936	AFG3L1	A	0.2972	0.1812	1.108 (0.953, 1.289)	1.35	MelGene meta- analysis
rs8059973 <sup>2</sup>	16	90079534	DBNDD1	A	0.1814	0.9167	1.010 (0.843, 1.209)	0.74	Bishop et al., 2009
rs17305657 <sup>2</sup>	20	31806588	C20orf71	C	0.02324	0.2198	1.312 (0.849, 2.025)	1.58	Brown et al., 2008
rs4911414	20	32729444	(ASIP)	T	0.2535	0.2643	0.912 (0.775, 1.072)	1.16	MelGene meta- analysis
rs6058017 <sup>5</sup>	20	32856998	ASIP	G	0.1409	0.000412	1.406 (1.163, 1.699)	0.91	MelGene meta- analysis
rs17305573 <sup>3</sup>	20	33180152	PIGU	C	-	-	-	-	
rs4911442	20	33355046	NCOA6	G	0.04887	0.05595	1.343 (0.992, 1.819)	1.28	MelGene meta- analysis
rs1885120 <sup>2</sup>	20	33576989	MYH7B	C	0.01884	0.003086	1.944 (1.242, 3.041)	1.55	MelGene meta- analysis
rs1015362 <sup>5</sup>	20	37738612	(ASIP)	A	0.2895	0.1906	0.902 (0.772, 1.053)	0.95	MelGene meta- analysis
rs45430 <sup>2</sup>	21	42746081	MX2	G	0.4143	0.1772	0.907 (0.787, 1.045)	0.88	Barrett et al., 2011
rs6001027	22	38545619	PLA2G6	G	0.3785	0.8839	0.989 (0.857, 1.142)	0.86	MelGene meta- analysis
Συντομογραφίες: OR=Odds Ratio, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης, ΣΕΑ= Συχνότητα Ελάσσονος Αλληλόμορφου									



<sup>1</sup>“Πλησιέστερο Γονίδιο” υποδηλώνει το γονίδιο στον αντίστοιχο γενετικό τόπο ή ένα γειτονικό γονίδιο στον αντίστοιχο γενετικό τόπο (που σημειώνεται στην παρένθεση) εάν ο ίδιος ο πολυμορφισμός δεν χαρτογραφείται σε μια περιοχή γονιδίου. Σημειώνεται ότι αυτά τα γονίδια δεν είναι αναγκαστικά τα γονίδια που επηρεάζονται λειτουργικά από τη γενετική συσχέτιση που εντοπίζεται σε αυτόν τον τόπο

<sup>2</sup>Πολυμορφισμοί που συμπεριλαμβάνονται στο ΓΔΚ<sub>ΕΥΡ</sub>.

<sup>3</sup>Πολυμορφισμοί που δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση λόγω επιτυχία γονοτύπησης <0.97.

<sup>4</sup>Ο πολυμορφισμός rs149617956 αποκλείστηκε από την ανάλυση καθώς ήταν μονομορφικός.

<sup>5</sup>Πολυμορφισμοί που επιλέχθηκαν από την Melgene λόγω της βιολογικής τους σημαντικότητας.

<sup>6</sup>Απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Πολυμορφισμοί με  $P < 8.5 \times 10^{-4}$  επιβίωσαν από τη διόρθωση Bonferroni.

### 2.1.3 Αποτελέσματα

Τα δημογραφικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των 800 ασθενών με μελάνωμα και των 800 μαρτύρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Πενήντα πέντε από τους 59 πολυμορφισμούς είχαν επιτυχία γονοτύπησης  $\geq 97\%$ . Στην τελική ανάλυση εξετάστηκαν 53 πολυμορφισμοί, εκ των οποίων οι 26 είχαν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας.

**Πίνακας 5. Δημογραφικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μελάνωμα και των υγείων μαρτύρων**

	<b>Ασθενείς (n=800)</b>	<b>Μάρτυρες (n=800)</b>	<b>P τιμή<sup>1</sup></b>
<b>Διάμεση τιμή ηλικίας, έτη (IQR; εύρος)</b>	53 (41-66; 17-97)	41 (31-53; 19-80)	<b>0.005</b>
Ελλείπουσες τιμές (N)	40	33	
<b>Φύλο, N (%)</b>			0.201
Άνδρες	394 (49.25%)	408 (51.00%)	
Γυναίκες	406 (50.75%)	365 (45.63%)	
Ελλείπουσες τιμές (N)	0	27 (3.37%)	
<b>Χρώμα Μαλλιών</b>			0.082
Ξανθό	79 (9.88%)	47 (5.88%)	
Κόκκινο	21 (2.63%)	25 (3.13%)	
Ανοιχτό καφέ	216 (27.00%)	245 (30.63%)	
Σκούρο καφέ	278 (34.75%)	333 (41.63%)	
Μαύρο	74 (9.25%)	97 (12.13%)	
Ελλείπουσες τιμές (N)	132 (16.50%)	53 (6.63%)	
<b>Χρώμα Ματιών</b>			<b>0.007</b>
Γκρι/Μπλε	87 (10.88%)	73 (9.13%)	
Πράσινο	144 (18.00%)	119 (14.88%)	
Ανοιχτό καφέ	183 (22.88%)	226 (28.25%)	
Σκούρο καφέ	232 (19.00%)	316 (39.50%)	
Μαύρο	3 (0.38%)	11 (1.38%)	
Ελλείπουσες τιμές (N)	151 (18.88%)	55 (6.88%)	
<b>Χρώμα Δέρματος</b>			0.200
Λευκό	372 (46.50%)	294 (36.75%)	
Ανοιχτό καφέ	277 (34.63%)	325 (40.63%)	

Σκούρο	20 (2.50%)	124 (15.50%)	
Ελλείπουσες τιμές (N)	131 (16.38%)	57 (7.13%)	
<b>Φωτότυπος Δέρματος</b>			<b>0.075</b>
I	33 (4.13%)	43 (5.38%)	
II	303 (37.88%)	243 (30.38%)	
III	234 (29.25%)	316 (39.50%)	
IV	98 (12.25%)	127 (15.88%)	
Ελλείπουσες τιμές (N)	132 (16.50%)	71 (8.88%)	
<b>Ικανότητα Μαυρίσματος<sup>2</sup></b>			<b>0.048</b>
Κάψιμο	96 (12%)	122 (15.25%)	
Ελαφρύ μαύρισμα	287 (35.88%)	258 (32.25%)	
Κάψιμο και εν συνεχεία μαύρισμα	207 (25.88%)	254 (31.75%)	
Βαθύ μαύρισμα	73 (9.13%)	81 (10.13%)	
Ελλειπούσες τιμές (N)	137 (17.3%)	85 (10.63%)	
<sup>1</sup> Αποτελέσματα από Wilcoxon-Mann-Whitney test για τη σύγκριση της ηλικίας μεταξύ ασθενών και μαρτύρων; Αποτελέσματα από chi-square test για τη σύγκριση όλων των άλλων μεταβλητών μεταξύ ασθενών και μαρτύρων; Στην τιμή P δεν περιλαμβάνονται οι ελλείπουσες τιμές. <sup>2</sup> Συμβολίζει τις απαντήσεις στην ερώτηση “Πως αντιδρά το δέρμα σας όταν κάνετε ηλιοθεραπεία κατά τις πρώτες βδομάδες των διακοπών σας”.			

## Συσχέτιση μεταξύ των υπό εξέταση πολυμορφισμών και του κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος

Η μονοπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση υποθέτοντας αθροιστικό μοντέλο κατέδειξε 15 πολυμορφισμούς που σχετίστηκαν με το μελάνωμα σε επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$  και με τους εκτιμητές επίδρασης να έχουν την ίδια κατεύθυνση με αυτή που έχει ανεφερθεί από την πηγή από την οποία προέρχονται (Πίνακας 6). Στους πολυμορφισμούς αυτούς περιλαμβάνονται 10 που έχουν αναφερθεί ως στατιστικά σημαντικοί σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο σημαντικότητας, συγκεκριμένα οι rs16891982, rs1805007, rs401681, rs1885120, rs4636294 και rs10931936 (31), καθώς και οι rs12918773, rs10739221, rs4778138 και rs17119490 (44, 84, 85). Από τους πέντε νέους γενετικούς τόπους που εντοπίστηκαν στην πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση GWAS (44), ο πολυμορφισμός rs10739221 κοντά στο TMEM38B, το ZNF462 και το RAD23B καθώς και ο πολυμορφισμός rs4778138 (OCA2) συσχετίστηκαν σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στα

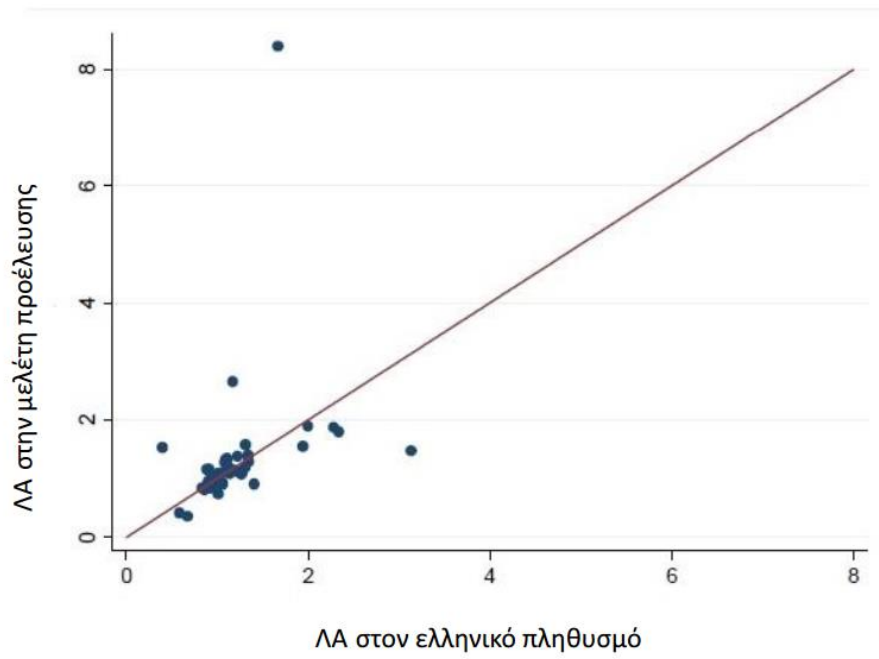
δεδομένα μας (rs10739221:  $\lambda A= 1.21$ ,  $P= 0.015$ ; rs4778138:  $\lambda A=0.83$ ,  $P= 0.014$ , Πίνακας 6) (44).

Στον Πίνακα 4 καθώς και στην Εικόνα 6 διακρίνονται οι εκτιμητές συσχέτισης των υπό εξέταση πολυμορφισμών με το μελάνωμα στα δεδομένα μας, καθώς και στις μελέτες από τις οποίες έχουν προέλθει. Γενικά παρατηρείται μία συσχέτιση μετρίου μεγέθους μεταξύ των εκτιμητών στον ελληνικό πληθυσμό της μελέτης μας σε σχέση με αυτούς που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες ( $r^2=0.41$ ,  $P=0.038$  για τους στατιστικά σημαντικούς σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο σημαντικότητας πολυμορφισμούς,  $n=26$ ;  $r^2=0.34$ ,  $P=0.013$  για όλους τους πολυμορφισμούς,  $n=53$ ). Η συσχέτιση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων κινδύνου, μεταξύ του ελληνικού πληθυσμού και ενός ευρωπαϊκού πληθυσμού που προέρχεται από την πλατφόρμα 1000G ήταν αρκετά υψηλή ( $r^2=0.97$ ) (Πίνακας 7, Εικόνα 7).

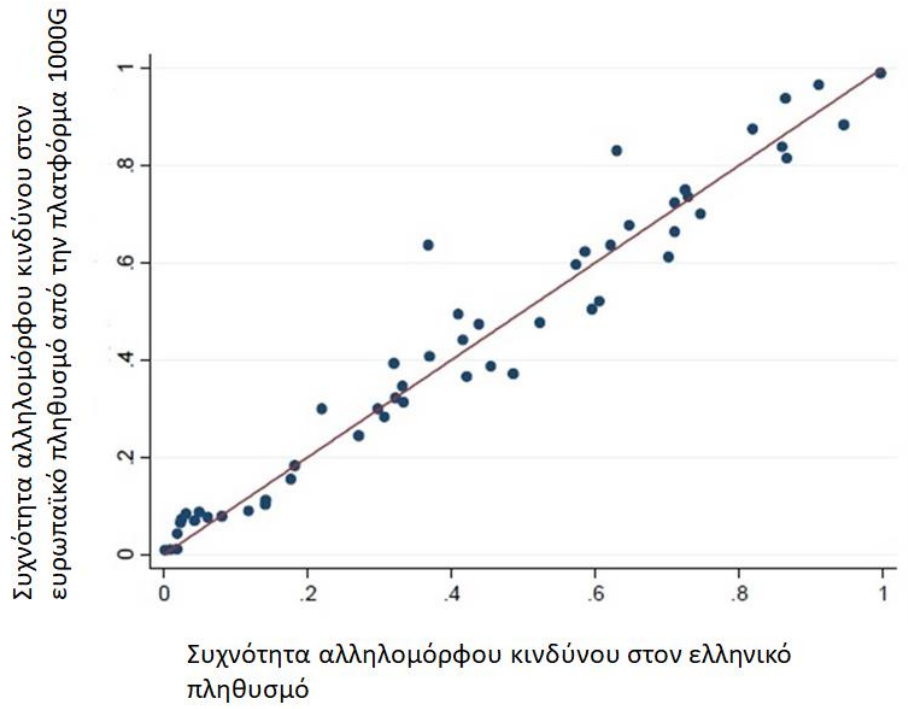
Πίνακας 6. Στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα από τη μονοπαραγοντική ανάλυση των 53 επιλεγμένων πολυμορφισμών

Πολυμορφισμός	Πλησιέστερο Γονίδιο <sup>4</sup>	Συχνότητα Ελλάσσονος Αλληλομόρφου	Μονομεταβλητή Ανάλυση		Λειτουργικότητα
			P τιμή	ΛΑ (95% ΔΕ)	
rs12918773 <sup>1</sup>	(CDK10)	0.031	1.63x10 <sup>-6</sup>	2.28 (1.61, 3.22)	Μελάγχρωση
rs16891982 <sup>1</sup>	SLC45A2	0.135	3.82x10 <sup>-6</sup>	0.59 (0.47, 0.74)	Μελάγχρωση
rs1805007 <sup>1</sup>	MC1R	0.024	8.22x10 <sup>-6</sup>	2.34 (1.59, 3.43)	Μελάγχρωση
rs11547464 <sup>1</sup>	MC1R	0.009	1.04x10 <sup>-4</sup>	3.13 (1.71, 5.75)	Μελάγχρωση
rs401681 <sup>1</sup>	CLPTM1L	0.416	2.23x10 <sup>-4</sup>	1.30 (1.13, 1.50)	Αριθμός σπύλων
rs12913832 <sup>1</sup>	HERC2	0.368	7.78x10 <sup>-4</sup>	1.28 (1.11, 1.47)	Μελάγχρωση
rs1805005	MC1R	0.141	2.56x10 <sup>-3</sup>	1.34 (1.11, 1.62)	Μελάγχρωση
rs1885120	MYH7B	0.019	3.09x10 <sup>-3</sup>	1.94 (1.24, 3.04)	Μελάγχρωση
rs35390	SLC45A2	0.089	3.46x10 <sup>-3</sup>	0.67 (0.51, 0.88)	Μελάγχρωση
rs10739221 <sup>2</sup>	(TMEM38B, ZNF462, RAD23B)	0.271	0.015	1.21 (1.04, 1.41)	Διαγονιδιακός τόπος
rs4778138 <sup>2</sup>	OCA2	0.370	0.014	0.83 (0.72, 0.96)	Μελάγχρωση
rs3768080	NID1	0.4095	0.026	1.17 (1.02, 1.35)	Υποδόρια Μεμβράνη
rs10931936	CASP8	0.307	0.030	1.18 (1.02, 1.37)	Απόπτωση
rs17119490	LOC101927549	0.01757	0.033	1.67 (1.04, 2.68)	Διαγονιδιακός τόπος

rs4636294	MTAP	0.4044	0.030	0.85 (0.74, 0.98)	Αριθμός σπίλων
<p>Συντομογραφίες: ΛΑ=Λόγος Αναλογιών, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης</p> <p><sup>1</sup> Πολυμορφισμοί που επιβίωσαν από τη διόρθωση Bonferroni</p> <p><sup>2</sup> Πολυμορφισμοί που προήλθαν από την GWAS μετα-ανάλυση (Law et. al, 2015) και επικυρώθηκαν στην κοόρτη μας</p> <p><sup>3</sup> “Πλησιέστερο Γονίδιο” υποδηλώνει το γονίδιο στον αντίστοιχο γενετικό τόπο ή ένα γειτονικό γονίδιο στον αντίστοιχο γενετικό τόπο (που σημειώνεται στην παρένθεση) εάν ο ίδιος ο πολυμορφισμός δεν χαρτογραφείται σε μια περιοχή γονιδίου. Σημειώνεται ότι αυτά τα γονίδια δεν είναι αναγκαστικά τα γονίδια που επηρεάζονται λειτουργικά από τη γενετική συσχέτιση που εντοπίζεται σε αυτόν τον τόπο</p>					



Εικόνα 6. Συσχέτιση των εκτιμητών ΛΑ που βρέθηκαν στο ελληνικό δείγμα και εκείνων που προέρχονται από την MelGene, την GWAS από την οποία προήλθαν ή τη μελέτη Law et al., 2015



Εικόνα 7. Συσχέτιση των συχνοτήτων του αλληλομόρφου κινδύνου στο ελληνικό δείγμα και ενός ευρωπαϊκού πληθυσμού που προέρχεται από την πλατφόρμα 1000G



Πίνακας 7. Συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου στον ελληνικό πληθυσμό και σε έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό που προέρχεται από την πλατφόρμα 1000G

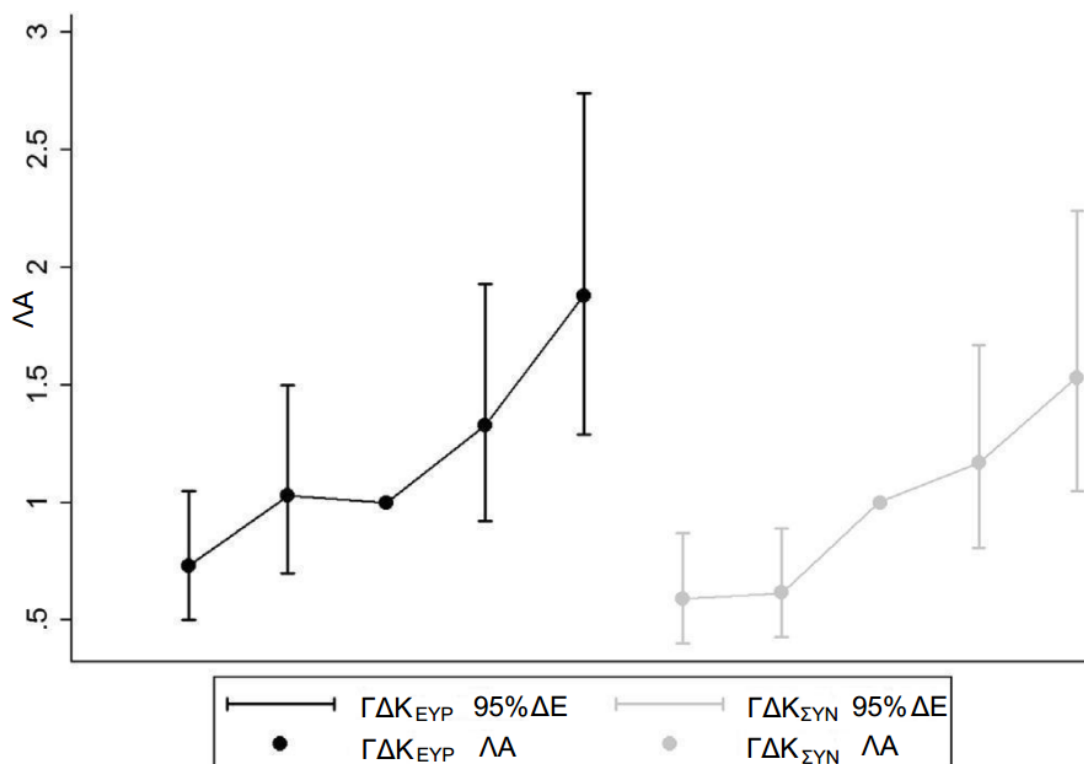
Πολυμορφισμός	Αλληλόμορφο κινδύνου στον Ελληνικό πληθυσμό του δείγματος	Συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου στον Ελληνικό πληθυσμό του δείγματος (95% ΔΕ)	Συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό από την πλατφόρμα 1000G (95% ΔΕ)
rs1011970	T	0.177 (0.15-0.203)	0.155 (0.122-0.188)
rs1015362	G	0.711 (0.679-0.742)	0.723 (0.683-0.763)
rs1035142	T	0.455 (0.42-0.489)	0.386 (0.342-0.429)
rs1042602	A	0.486 (0.451-0.52)	0.372 (0.329-0.415)
rs10739221	T	0.271 (0.24-0.302)	0.244 (0.205-0.282)
rs10757257	G	0.702 (0.671-0.734)	0.612 (0.568-0.655)
rs10931936	T	0.307 (0.275-0.339)	0.283 (0.243-0.323)
rs11515	C	0.819 (0.792-0.846)	0.875 (0.845-0.905)
rs11547464	A	0.009 (0.002-0.015)	0.009 (0.0002-0.018)
rs12203592	C	0.945 (0.93-0.961)	0.884 (0.855-0.913)
rs12696304	C	0.729 (0.699-0.76)	0.735 (0.695-0.774)
rs12913832	G	0.368 (0.334-0.401)	0.636(0.593-0.679)
rs12918773	A	0.031 (0.019-0.043)	0.084 (0.059-0.109)
rs13097028	C	0.711 (0.679-0.742)	0.664 (0.623-0.706)
rs1408799	T	0.332 (0.299-0.365)	0.346 (0.303-0.388)
rs1485993	T	0.421 (0.387-0.455)	0.365 (0.322-0.408)
rs1544410	G	0.573 (0.539-0.608)	0.596 (0.552-0.639)
rs1636744	A	0.370 (0.336-0.403)	0.407 (0.363-0.451)
rs16891982	G	0.865 (0.841-0.888)	0.938(0.916-0.960)
rs17119490	A	0.018 (0.008-0.027)	0.011 (0.0008-0.021)
rs17305657	C	0.023 (0.013-0.034)	0.065 (0.0425-0.087)
rs17655	C	0.725 (0.694-0.756)	0.750 (0.711-0.789)
rs1800407	A	0.061 (0.044-0.077)	0.076 (0.052-0.100)
rs1801516	G	0.861 (0.836-0.885)	0.838 (0.805-0.871)
rs1805005	T	0.141 (0.117-0.166)	0.112 (0.083-0.140)
rs1805006	C	0.997 (0.993-1)	0.990 (0.980-0.999)
rs1805007	T	0.025 (0.014-0.035)	0.072 (0.048-0.095)
rs1805009	C	0.001 (-0.001-0.004)	0.008 (-0.0007-0.017)
rs1847142	A	0.22 (0.191-0.249)	0.299 (0.258-0.340)

rs1885120	C	0.019 (0.009-0.028)	0.042 (0.023-0.060)
rs2228479	A	0.043 (0.029-0.057)	0.069 (0.04-0.092)
rs2995264	G	0.118 (0.096-0.14)	0.089 (0.063-0.115)
rs3088440	A	0.08 (0.061-0.099)	0.079 (0.054-0.103)
rs3219090	G	0.647 (0.614-0.68)	0.676 (0.634-0.718)
rs35390	A	0.911 (0.891-0.931)	0.965 (0.948-0.982)
rs3768080	G	0.41 (0.375-0.444)	0.494 (0.449-0.538)
rs401681	T	0.416 (0.382-0.45)	0.441 (0.397-0.485)
rs4238833	G	0.322 (0.289-0.354)	0.322 (0.280-0.363)
rs45430	A	0.586 (0.552-0.62)	0.622 (0.579-0.665)
rs4636294	A	0.596 (0.562-0.63)	0.504 (0.459-0.549)
rs4698934	T	0.867 (0.843-0.89)	0.815 (0.780-0.849)
rs4778138	A	0.63 (0.597-0.664)	0.831 (0.797-0.865)
rs4785763	A	0.297 (0.266-0.329)	0.299 (0.258-0.340)
rs4911414	G	0.747 (0.716-0.777)	0.700 (0.659-0.741)
rs4911442	G	0.049 (0.034-0.064)	0.087 (0.06-0.113)
rs6001027	A	0.622 (0.588-0.655)	0.636 (0.592-0.679)
rs6058017	G	0.141 (0.117-0.165)	0.103 (0.075-0.130)
rs6914598	C	0.333 (0.3-0.366)	0.313 (0.271-0.354)
rs7023329	A	0.606 (0.572-0.64)	0.520 (0.475-0.564)
rs7188458	A	0.32 (0.288-0.352)	0.393 (0.349-0.437)
rs7412746	C	0.523 (0.489-0.558)	0.477 (0.432-0.521)
rs8059973	A	0.181 (0.155-0.208)	0.183 (0.148-0.218)
rs872071	G	0.439 (0.404-0.473)	0.474 (0.429-0.518)

<sup>1</sup>ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης

### Συσχέτιση μεταξύ ΓΔΚ και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος

Η ανάλυση για το ΓΔΚ<sub>ΕΥΡ</sub> κατέληξε σε εκτιμητή ΛΑ=1.36 (95% ΔΕ: 1.21-1.52;  $P=1.1 \times 10^{-7}$ ). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η ανάλυση για το ΓΔΚ<sub>ΣΥΝ</sub> με ΛΑ=1.39 (95% ΔΕ: 1.21-1.52;  $P=1.1 \times 10^{-7}$ ). Οι προσαρμοσμένοι εκτιμητές ΛΑ φανέρωσαν μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ του ΓΔΚ και του κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος με αυξανόμενη τάση (trend test για τα πεμπτημόρια του ΓΔΚ<sub>ΕΥΡ</sub>  $P=1.4 \times 10^{-7}$ ; trend test για τα πεμπτημόρια του ΓΔΚ<sub>ΣΥΝ</sub>  $P=3.2 \times 10^{-9}$ ) (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Συσχέτιση ΓΔΚ και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος στα διαφορετικά πεμπτημόρια του ΓΔΚ<sub>EYP</sub> και ΓΔΚ<sub>SYN</sub>. Οι ΛΑ για την ανάπτυξη μελανώματος ανά πεμπτημόριο συγκρίνονται με τα άτομα στο μέσο πεμπτημόριο και για τα δύο ΓΔΚ.

Οι ΛΑ για τους συμμετέχοντες στο χαμηλότερο πεμπτημόριο και στο υψηλότερο πεμπτημόριο σε σύγκριση με το μεσαίο πεμπτημόριο ήταν αντίστοιχα 0.73 (95% ΔΕ: 0.50-1.05) και 1.88 (95% ΔΕ: 1.29-2.74). Η διακριτική ικανότητα του ΓΔΚ<sub>EYP</sub> ήταν μέτρια με c-statistic=0.575 (95% ΔΕ: 0.549-0.604). Όταν εξετάστηκαν μόνο οι παραδοσιακοί φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου (δηλ. φύλο, ηλικία, χρώμα ματιών, χρώμα μαλλιών, χρώμα δέρματος, φωτοτύπο δέρματος και ικανότητα μαυρίσματος), τότε η τιμή του c-statistic ήταν 0.764 (95% ΔΕ: 0.741-0.787). Με τον συνδυασμό γενετικών και φαινοτυπικών παραγόντων κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου του ΓΔΚ<sub>EYP</sub>, η τιμή του c-statistic έγινε 0.775 (95% ΔΕ: 0.752-0.797; η τιμή *P* για την ΠΚΚ ήταν 0.007). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το ΓΔΚ<sub>SYN</sub> (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8. Αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας των τριών μοντέλων προγνωστικών παραγόντων κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος στον Ελληνικό πληθυσμό**

	<b>ΠΚΚ</b>	<b>95% ΔΕ</b>
<b>Φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου<sup>1</sup></b>	0.764	0.741-0.787
<b>Φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου+ ΓΔΚ<sub>EYP</sub></b>	0.775	0.752-0.797
<b>Φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου+ ΓΔΚ<sub>ΣΥΝ</sub></b>	0.775	0.753-0.798
Συντομογραφίες: ΠΚΚ= Περιοχή κάτωθι της καμπύλης, ΓΔΚ=Γενετικός Δείκτης Κινδύνου, EYP=Σημαντικότητα σε ευρυγονιδιωματικό επίπεδο, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης <sup>1</sup> Φαινοτυπικοί παράγοντες κινδύνου= φύλο, ηλικία, χρώμα ματιών, χρώμα μαλλιών, χρώμα δέρματος, φωτότυπος και ικανότητα μαυρίσματος		

Το μέσο τετραγωνικό σφάλμα ρίζας για την εσωτερική εγκυρότητα των προγνωστικών μοντέλων κυμάνθηκε από 0.453 έως 0.465 για το φαινοτυπικό μοντέλο. Όταν προστέθηκε ο ΓΔΚ<sub>EYP</sub>, το μέσο τετραγωνικό σφάλμα ρίζας κυμάνθηκε από 0.442 έως 0.486. Και στα δύο μοντέλα, η επικύρωση έδειξε πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου. Επιπλέον, η αξιολόγηση της βαθμονόμησης έδειξε ότι οι προβλεπόμενες πιθανότητες συμφωνούν με τις παρατηρούμενες πιθανότητες (Hosmer-Lemeshow test P=0.77). Για την ανάλυση ευαισθησίας αποκλείστηκαν όλοι οι συμμετέχοντες με ελλείπουσες τιμές. Συνολικά ελήφθησαν υπόψη 1.285 συμμετέχοντες και το c-statistic για το φαινοτυπικό μοντέλο ήταν 0.728 (95% ΔΕ: 0.701-0.755). Το μοντέλο που περιείχε ΓΔΚ<sub>EYP</sub> έδωσε c-statistic 0.741 (95% ΔΕ: 0.741-0.767). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΓΔΚ και ηλικίας δεν ήταν σημαντικές (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9. Συσχέτιση μεταξύ ΓΔΚ και ανάπτυξης μελανώματος σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες**

Ηλικιακή ομάδα <sup>1</sup>	ΓΔΚ <sub>ΕΥΡ</sub>		ΓΔΚ <sub>ΣΥΝ</sub>	
	ΛΑ <sup>2</sup> (95% ΔΕ)	P τιμή	ΛΑ <sup>2</sup> (95% ΔΕ)	P τιμή
<36	1.54 (1.21-1.98)	0.001	1.59 (1.20-2.08)	0.001
36-47	1.43 (1.13-1.80)	0.003	1.37 (1.07-1.73)	0.012
48-61	1.31 (1.04-1.64)	0.020	1.31 (1.05-1.63)	0.015
>61	1.20 (0.93-1.54)	0.171	1.32 (1.01-1.72)	0.041
	ΛΑ Αλληλεπίδρασης <sup>3</sup> (95% ΔΕ)		ΛΑ Αλληλεπίδρασης <sup>3</sup> (95% ΔΕ)	
<b>Αλληλεπίδραση μεταξύ ΓΔΚ και Ηλικίας</b>	0.97 (0.91, 1.04)		0.98 (0.92, 1.05)	
<b>P τιμή</b> <sub>αλληλεπίδρασης</sub>	0.392		0.649	

Συντομογραφίες: ΛΑ=Λόγος Αναλογιών, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης, ΓΔΚ=Γενετικός Δείκτης Κινδύνου

<sup>1</sup> Ηλικία διάγνωσης για τους ασθενείς με μελάνωμα και ηλικία που έγινε η συνέντευξη για τους μάρτυρες

<sup>2</sup> ΛΑ της συσχέτισης μεταξύ του ΓΔΚ και του κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος προσαρμόστηκε για τις μεταβλητές του φύλου, ηλικίας, χρώματος ματιών, χρώματος μαλλιών, χρώματος δέρματος, φωτότυπου και ικανότητας μαυρίσματος.

<sup>3</sup> ΛΑ ανά 10 έτη για την αλληλεπίδραση μεταξύ ΓΔΚ και ηλικίας

Κάθε σταθμισμένος ΓΔΚ τυποποιήθηκε ανά μονάδα αύξησης στον πληθυσμό των μαρτύρων.

### 2.1.4 Συζήτηση

Εκτιμήθηκαν συνολικά πάνω από 50 υποψήφιοι για συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος πολυμορφισμοί σε ένα μεγάλο, ανεξάρτητο Ελληνικό πληθυσμό. Αποδείχθηκε πως η συμπερίληψη κοινών πολυμορφισμών σε ένα μοντέλο πρόβλεψης κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος οδηγεί σε μέτρια βελτίωση της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου σε σύγκριση με μοντέλο πρόβλεψης κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος που βασίζεται μόνο σε φαινοτυπικούς παράγοντες.

Η επιλογή των πολυμορφισμών έγινε κυρίως από τη βάση Melgene, η οποία συστηματικά επεξεργάζεται και μετα-αναλύει όλους τους δημοσιευμένους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με το μελάνωμα (31). Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί με σημαντικές επιδράσεις στο σύνολο δεδομένων μας αφορούσαν γονίδια που σχετίζονται με χαρακτηριστικά μελάγχρωσης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η πλειοψηφία αυτών των πολυμορφισμών ασκεί συγκριτικά μεγάλες επιπτώσεις στον κίνδυνο της νόσου, για αυτό υπήρξε αρκετή ισχύς ώστε να ανιχνευθούν. Οι 11 από τους 26 πολυμορφισμούς που αναφέρθηκαν σαν στατιστικά σημαντικοί σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) στην αρχική GWAS μελέτη (83-88, 97) ή στην μετα-ανάλυση που ακολούθησε από την

Melgene επικυρώθηκαν στην μελέτη μας σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Από τους 5 νέους πολυμορφισμούς που ανακαλύφθηκαν στην μεγαλύτερη GWAS για το μελάνωμα (44), με 15,990 ασθενείς με μελάνωμα και 26,409 μάρτυρες, ένας διαγονιδιακός τόπος στο 9q31.2 (rs10739221), κοντά στα TMEM38B, το ZNP462, και RAD23B, επικυρώθηκε στη μελέτη μας. Επιπλέον, επικυρώθηκε ο πολυμορφισμός στο OCA2, ένας πιθανός ρυθμιστής του χρώματος των ματιών, που περιγράφεται από τους Law et al. (44).

Αρκετά μοντέλα πρόγνωσης κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος έχουν δημοσιευθεί, τα οποία λαμβάνουν υπόψη τους γνωστούς φαινοτυπικούς και κλινικούς παράγοντες κινδύνου (98-100), τα περισσότερα εκ των οποίων είχαν μια μέτρια διακριτική ικανότητα. Η απόδοσή τους μεταβάλλονταν μετά την ανεξάρτητη επικύρωση εξαιτίας της κακής βαθμονόμησης, της έλλειψης αναπαραγωγικών τυποποιημένων στοιχείων αξιολόγησης ή της ετερογένειας στους ορισμούς των προγνωστικών παραγόντων (99). Κατασκευάζοντας έναν ΓΔΚ προσπαθήσαμε να αξιοποιήσουμε διεξοδικά τις διαθέσιμες γενετικές πληροφορίες για την πρόβλεψη κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Διαπιστώθηκε πως ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος συσχετίστηκε με τον ΓΔΚ ακόμη και όταν προσαρμόστηκε για παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, όπως το δέρμα, το χρώμα των μαλλιών και το χρώμα των ματιών. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και όταν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του ΓΔΚ μόνο οι στατιστικά σημαντικοί σε ευρυγονιδιωματικό επίπεδο πολυμορφισμοί, αλλά και όταν χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι 53 πολυμορφισμοί. Το πολυμεταβλητό μοντέλο πρόβλεψης συνδυάζοντας τους πιο ισχυρούς γενετικούς παράγοντες (ΓΔΚ<sub>ΕΥΡ</sub>) και τους φαινοτυπικούς παράγοντες κατέληξε σε c-statistic ίσο με 0.775. Η σημαντική, αλλά οριακή αύξηση 0.011 του c-statistic που επιτεύχθηκε με την προσθήκη υποψήφων για τον κίνδυνο της ασθένειας πολυμορφισμών σε ένα φαινοτυπικό μοντέλο δεν υποστηρίζει σθεναρά την κλινική χρησιμότητα του γενετικού προφίλ στην εξατομικευμένη πρόβλεψη κινδύνου, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με μελέτες που αξιολογούν την κλινική χρησιμότητα του ΓΔΚ σε άλλες ασθένειες. Για παράδειγμα, σε μελέτες που διεξήχθησαν για καρδιαγγειακά συμπτώματα, η προσθήκη του ΓΔΚ σε συμβατικούς παράγοντες κινδύνου προσφέρει οριακή βελτίωση στην προγνωστική ικανότητα (101-103).

Υπάρχει περιορισμένος αριθμός προγνωστικών μοντέλων που περιλαμβάνουν γενετικούς παράγοντες για το μελάνωμα (104-108). Δύο μελέτες επικεντρώθηκαν στην επίδραση του MC1R στην πρόγνωση του μελανώματος (104, 106). Η μελέτη των Cust et. al (104) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το MC1R είναι ένας καλύτερος προγνωστικός

παράγοντας από τα χαρακτηριστικά της μελάγχρωσης για το μελάνωμα που εμφανίζεται σε πρώιμη ηλικία, ενώ οι Penn et al. (106) ανέφεραν ότι η προσθήκη των πληροφοριών του γονότυπου MC1R στο βασικό μοντέλο είχε ως αποτέλεσμα μια ελαφρά αλλά στατιστικά σημαντική βελτίωση της πρόβλεψης κινδύνου, ειδικά σε ασθενείς επιρρεπείς σε εμφάνιση σπίλων. Παλιότερη μελέτη των Stefanaki et. al (107) έδειξε πως η προσθήκη 8 πολυμορφισμών, που σχετίζονταν με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε επίπεδο  $\alpha=0.05$ , σε ένα κλινικό μοντέλο δεν βελτίωσε ουσιαστικά την πρόβλεψη του μελανώματος. Στη μελέτη μας, καθώς και σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη ενός ΓΔΚ βασισμένου σε 11 πολυμορφισμούς που δοκιμάστηκαν σε 1,804 ασθενείς με μελάνωμα και 1,026 μάρτυρες (105), η διακριτική ικανότητα του συμβατικού φαινοτυπικού μοντέλου αυξήθηκε όταν ο ΓΔΚ συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο (c-statistic 0.775 στη δική μας μελέτη και c-statistic 0.69 στη μελέτη των Fang et. al (105)). Αν και οι διαφορές μεταξύ των δύο μελετών στο σχεδιασμό της μελέτης και του πληθυσμού δεν επιτρέπουν άμεση σύγκριση, η συσχέτιση του ΓΔΚ με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ήταν σημαντική και στις δύο περιπτώσεις (ΛΑ=1.36 (95% ΔΕ: 1.21-1.59) για το ΓΔΚ<sub>EVP</sub> μοντέλο μας και ΛΑ=1.12 (95% ΔΕ: 1.06-1.18) για το μοντέλο των Fang et. al (105), προσαρμόζοντας για παρόμοιους παράγοντες κινδύνου).

Το δείγμα μας αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη σειρά ασθενών μελανώματος στην Ελλάδα. Ο ΓΔΚ κατασκευάστηκε βάση επικυρωμένων πολυμορφισμών που συσχετίστηκαν με το μελάνωμα σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας σε παλιότερες μελέτες, ανεξάρτητα της συμπεριφοράς τους στο δείγμα των ασθενών-μαρτύρων μας. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η μεροληψία που θα υπήρχε αν η κατασκευή του δείκτη βασιζόταν σε πολυμορφισμούς που έδειχναν ευρυ-γονιδιωματική σημαντικότητα στο δικό μας δείγμα. Η μελέτη αυτή έχει και κάποιους περιορισμούς με βασικότερο το μικρό μέγεθος δείγματος. Επιπλέον, διάφορες τιμές σχετικά με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των σπίλων, λείπουν λόγω της ποικιλίας των πληροφοριών και των ερωτηματολογίων που χρησιμοποιούνται στα συμμετέχοντα κέντρα. Οι ασθενείς με μελάνωμα και οι μάρτυρες διαφέρουν ως προς την ηλικία και τη σχέση των δεδομένων που λείπουν. Επιπλέον, δεν συμπεριλήφθηκε το οικογενειακό ιστορικό ως παράγοντας κινδύνου, επειδή αυτές οι πληροφορίες δεν ήταν διαθέσιμες για τη μεγάλη πλειοψηφία των μαρτύρων. Οι αλγόριθμοι πρόβλεψης κινδύνου σε άλλους καρκίνους (π.χ., καρκίνος του μαστού) υποδεικνύουν ότι η συμπερίληψη οικογενειακού ιστορικού σε έναν ΓΔΚ οδηγεί σε ουσιαστική βελτίωση του μοντέλου πρόβλεψης κινδύνου (109, 110). Επίσης δε λήφθηκαν υπόψη αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίου-περιβάλλοντος και γονιδίου-

γονιδίου, κάτι που ίσως βελτιώνει τη διαστρωμάτωση του ΓΔΚ. Τέλος, παρά το γεγονός πως εξετάστηκε η εσωτερική εγκυρότητα των προγνωστικών μοντέλων, τα μοντέλα γενετικής πρόγνωσης για το μελάνωμα θα επωφεληθούν από πρόσθετες δοκιμές εξωτερικής επικύρωσης σε παρόμοιους (νοτιοευρωπαϊκούς) ή σε άλλους πληθυσμούς.

Εν κατακλείδι, επικυρώθηκε η συσχέτιση αρκετών πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στον πληθυσμό μας, επιβεβαιώνοντας την πολυγονική φύση της ασθένειας. Ερευνήθηκε η προγνωστική ικανότητα ενός ΓΔΚ που συμπεριελάμβανε αρκετούς από τους πολυμορφισμούς που έχουν καταγραφεί σε GWAS μελέτες να σχετίζονται με το μελάνωμα σε ευρυ-γονιδιωματικά σημαντικό επίπεδο. Η προσθήκη του ΓΔΚ σε ένα φαινοτυπικό μοντέλο βελτιώνει οριακά, αλλά όχι σημαντικά την προβλεπτική ικανότητά του. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, δεν μπορούμε να επιμείνουμε στην εφαρμογή αυτού του συγκεκριμένου γενετικού προφίλ σε μοντέλα πρόβλεψης κινδύνου μελανώματος, τουλάχιστον σε πληθυσμό της νότιας Ευρώπης.



## 2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΙΝΔΥΝΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΜΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ 11 ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

### 2.2.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να βρεθούν πολυμορφισμοί που να σχετίζονται ισχυρά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις υποψήφιου γονιδίου (31, 93). Ωστόσο, με την άνθηση του πεδίου της γενετικής, οι προσεγγίσεις υποψήφιου γονιδίου αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τις GWAS οι οποίες έριξαν φως στην αιτιοπαθογένεση του μελανώματος (43). Η σημαντικότερη GWAS για το μελάνωμα κατέδειξε 20 στατιστικά σημαντικούς σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο γενετικούς τόπους ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), με πέντε από αυτούς να καταγράφονται για πρώτη φορά (44).

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανακάλυψη και ταυτοποίηση νέων γενετικών τόπων που συνδέονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, χρησιμοποιώντας όλα τα υποψήφια γονίδια που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων MelGene ([www.melgene.org](http://www.melgene.org)), μια συνεχώς ενημερωμένη βάση δεδομένων για τις μελέτες γενετικής συσχέτισης που αφορούν τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (31, 92, 93). Η αξιολόγηση της συσχέτισης των υποψήφιων γενετικών τόπων με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος πραγματοποιήθηκε στη μεγαλύτερη GWAS που έχει δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για το μελάνωμα (44). Τα πιο ελπιδοφόρα σήματα επιλέχθηκαν για επικύρωση στη βάση δεδομένων της UK Biobank (<https://www.ukbiobank.ac.uk/>), μια προοπτική μελέτη κοόρτης από τη Μ.Βρετανία με ~500,000 συμμετέχοντες 40-69 ετών με εκτεταμένες φαινοτυπικές μετρήσεις και αρχεία καταγραφής ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος (75), καθώς και σε δύο ανεξάρτητα δείγματα ασθενών με μελάνωμα και υγιών μαρτύρων από την Ελλάδα και την Κύπρο. Τα αποτελέσματα της αρχικής GWAS και των τριών πληθυσμών συντέθηκαν με την μέθοδο της μετα-ανάλυσης.

## 2.2.2 Μεθοδολογία

### Επιλογή Πολυμορφισμών

Χρησιμοποιήσαμε τη βάση δεδομένων MelGene για να καταγράψουμε όλα τα υποψήφια γονίδια σχετικά με το μελάνωμα που έχουν δημοσιευθεί στη βιβλιογραφία. Η συσχέτιση των επιλεγμένων πολυμορφισμών ( $n=760$ ) με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος πραγματοποιήθηκε στη μεγαλύτερη GWAS που δημοσιεύθηκε μέχρι σήμερα για το μελάνωμα (44). Στο στάδιο της ανακάλυψης αυτής της μελέτης, 12,874 περιπτώσεις μελανώματος και 23,303 μάρτυρες από 11 GWAS συντέθηκαν χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση μετα-ανάλυσης και υπολογίστηκαν τα μεγέθη των επιδράσεών τους. Η γονοτύπηση έγινε χρησιμοποιώντας διάφορους εμπορικούς προσδιορισμούς και η καταγραφή των μη τυποποιημένων πολυμορφισμών (imputation) πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε μελέτη ακολουθώντας ένα κοινό πρωτόκολλο.

Προκειμένου να ιεραρχηθούν οι πολυμορφισμοί αυτοί και να αποφασιστεί ποιοι θα συνεχίσουν στο στάδιο της επικύρωσης, ορίστηκε ένα κατώτατο όριο σημαντικότητας με βάση τον αριθμό των ανεξάρτητων δοκιμών που εκτελέστηκαν και αποκλείστηκαν αυτοί οι πολυμορφισμοί που απέτυχαν να φθάσουν σε αυτό το όριο. Συγκεκριμένα, εφαρμόζοντας μια διόρθωση FDR για τον ικανό αριθμό των πολυμορφισμών που θα συμπεριληφθούν στην ανάλυση ( $n=760$ ) όπως προτείνεται από τους Benjamini και Liu (111), προσδιορίστηκε μια τιμή όριο  $P < 9.1 \times 10^{-5}$  για την ιεράρχηση των πολυμορφισμών.

Από τους πολυμορφισμούς που απέμειναν αποκλείστηκαν εκείνοι για τους οποίους ήταν ήδη γνωστό ότι συνδέονται άρρηκτα με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (43, 44). Επιπλέον, εξετάστηκε αν οι πολυμορφισμοί που απέμειναν ήταν σε ανισορροπία σύνδεσης (LD) με τους ήδη γνωστούς για τη συσχέτισή τους με το μελάνωμα πολυμορφισμούς χρησιμοποιώντας το εργαλείο SNiPA (1000 Genomes project, European population, Phase 3 v5) (96) και αποκλείστηκαν οι μη-ανεξάρτητοι πολυμορφισμοί ( $r^2 > 0.3$ ). Όλοι οι πολυμορφισμοί ευθυγραμμίστηκαν σύμφωνα με τον θετικό κλώνο για να αποφευχθούν τυχόν ασάφειες.

## Μελέτες επικύρωσης και γονοτύπησή τους

Οι πολυμορφισμοί με τιμή  $P < 9.1 \times 10^{-5}$  στη μετα-ανάλυση των 11 GWAS, εξετάστηκαν για τη συσχέτισή τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στην βιοτράπεζα UK Biobank και γονοτύπηθηκαν σε 2 επιπλέον μελέτες ασθενών μελανώματος και υγείων μαρτύρων από την Ελλάδα και την Κύπρο. Τα δεδομένα της UK Biobank περιέχουν γονότυπους για 488,377 συμμετέχοντες. Από τους συμμετέχοντες αυτούς, 438,427 έχουν γονοτυπηθεί σε 825,427 πολυμορφισμούς από το Affymetrix UK Biobank Axiom Array chip ενώ οι υπόλοιποι 49,950 γονοτυπήθηκαν σε 807,411 πολυμορφισμούς από το Affymetrix Affymetrix UK BiLEVE Axiom Array chip της μελέτης UK BiLEVE (112). Η καταγραφή των μη τυποποιημένων πολυμορφισμών (imputation) πραγματοποιήθηκε κεντρικά από την UK Biobank χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα αναφοράς που συγχώνευσε τις πλατφόρμες UK10K και 1000 Genomes Phase 3 καθώς επίσης και την Haplotype Reference Consortium (HRC) πλατφόρμα (113). Από τους 488,377 συμμετέχοντες της UK Biobank με διαθέσιμα γενετικά δεδομένα αποκλείστηκαν τα άτομα μη-ευρωπαϊκής προέλευσης και με τη χρήση των κεντρικά παρεχόμενων δεδομένων συγγενείας της UK Biobank, αποκλείστηκαν από την ανάλυση οποιαδήποτε ζεύγη συγγενών 1ου και 2ου βαθμού. Εντοπίστηκαν τα περιστατικά μελανώματος, μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Τα κεντρικά μητρώα του NHS παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις καταχωρήσεις καρκίνου και τους θανάτους που κωδικοποιούνται σύμφωνα με τη 10<sup>η</sup> αναθεώρηση της Διεθνούς Ταξινόμησης των Νοσημάτων (κωδικοί ICD-9 (172) και ICD-10 (C43) (WHO, <http://www.who.int/classifications/icd/en/>). Καταλήξαμε σε 2,871 περιπτώσεις καρκίνου από άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης, των οποίων η πρώτη διάγνωση καρκίνου ήταν μελάνωμα. Από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες της UK Biobank επιλέξαμε 349,984 υγείες μάρτυρες οι οποίοι δεν είχαν ποτέ διαγνωσθεί με καρκίνο ή είχαν αναφέρει την ύπαρξη καρκίνου μέσω αυτοαναφοράς και δεν είχαν καταχωρηθεί ποτέ στο εθνικό μητρώο καρκίνου.

Ο πληθυσμός από την Ελλάδα περιελάμβανε 771 περιπτώσεις μελανώματος και 744 μάρτυρες που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 2.1.2. (114). Εν συντομία, το ελληνικό δείγμα περιελάμβανε ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση μελανώματος από το Νοσοκομείο Α. Συγγρός στην Αθήνα και ένα συνεργαζόμενο ογκολογικό κέντρο (Νοσοκομείο Λαϊκό, Ογκολογική Κλινική) από το 2000 έως το 2014. Στην ομάδα των μαρτύρων συμμετείχαν αιμοδότες από ένα κέντρο αιμοδοσίας της Αθήνας και

άτομα με μικρές δερματικές παθήσεις και χωρίς ιστορικό κακοήθειας του δέρματος, οι οποίοι παρακολουθούνταν από τα εξωτερικά ιατρεία ασθενών του νοσοκομείου Α. Συγγρός. Όλα τα άτομα ήταν άνω των 18 ετών.

Ο κυπριακός πληθυσμός περιλάμβανε 32 ιστολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις κακοήθους μελανώματος και 201 υγιείς μάρτυρες. Οι μάρτυρες ήταν άτομα χωρίς καρκίνο που συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη MASTOS (115). Όλα τα άτομα ήταν άνω των 18 ετών.

Η γονότυπηση για το ελληνικό και κυπριακό δείγμα διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία TaqmanSNP Genotyping από την Thermo Fisher Scientific. Μετά την ενίσχυση PCR, διεξήχθη διάκριση αλληλομόρφων για να προσδιοριστούν τα αντίστοιχα αλληλόμορφα που υπάρχουν σε κάθε δείγμα DNA (SDS v.2.4, Applied Biosystems).

## Στατιστική ανάλυση

Από την μετα-ανάλυση των GWAS ελήφθησαν οι εκτιμητές ΛΑ καθώς και τα 95% ΔΕ τους για τους πολυμορφισμούς που πέρασαν τιμή όριο  $P$  που τέθηκε. Για τους πολυμορφισμούς που πέρασαν τιμή όριο  $P$  της FDR διόρθωσης εκτιμήθηκαν τα μεγέθη επίδρασης της συσχέτισής τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος πραγματοποιώντας λογιστική παλινδρόμηση στους πληθυσμούς επικύρωσης υποθέτοντας ένα προσθετικό γενετικό μοντέλο ανάλυσης (additive). Στη συνέχεια συντέθηκαν οι εκτιμητές που προέκυψαν από τους πληθυσμούς επικύρωσης χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση μετα-ανάλυσης σταθερών αποτελεσμάτων (fixed-effect meta-analysis). Τέλος, συντέθηκαν οι εκτιμητές από τους πληθυσμούς ανακάλυψης και επικύρωσης προκειμένου να λάβουμε μια συνολική εκτίμηση για τα υποψήφια γονίδια με τη μέθοδο της μετα-ανάλυσης σταθερών αποτελεσμάτων (fixed-effect meta-analysis). Μεταξύ των μελετών η ετερογένεια μετρήθηκε ποσοτικά χρησιμοποιώντας το  $I^2$  (116).

Για να θεωρηθεί ένας πολυμορφισμός επικυρωμένος έπρεπε να έχει  $P < 0.05$  στην σύνθεση των πληθυσμών επικύρωσης και να συμφωνεί στην κατεύθυνση του αποτελέσματος στους πληθυσμούς ανακάλυψης και επικύρωσης.

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα Stata 12 (StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP) και Plink 2.00 (<https://www.cog-genomics.org/plink/2.0/>) (117).

## Διερεύνηση των υποψήφιων πολυμορφισμών σε άλλες βάσεις γενετικών δεδομένων

Διερευνήθηκαν συσχετίσεις με άλλα γνωρίσματα και ασθένειες ώστε να επισημανθεί η πιθανή λειτουργική επίπτωση των υποψήφιων πολυμορφισμών σε διάφορους τύπους ιστών αναζητώντας eQTL βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων Phenoscanner (118) και Genotype-Tissue Expression dataset (GTEx) (119) διερευνήθηκαν περαιτέρω για να επισημάνουν ειδικούς τύπους ιστών που παρουσιάζουν eQTLs για τους υποψήφιους πολυμορφισμούς μας. Προτεραιότητα δόθηκε σε κυτταρικούς τύπους που είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στη βιολογία του μελανώματος (π.χ. δέρμα που εκτίθεται στον ήλιο), παρόλα αυτά αναζητήθηκαν και eQTLs από άλλους τύπους ιστών για να επισημάνουμε την πιθανή λειτουργική επίδραση των υποψήφιων πολυμορφισμών μας. Η βάση δεδομένων του Phenoscanner χρησιμοποιήθηκε και για να εντοπίσουμε GWAS που έχουν συσχετίσει τους υποψήφιους πολυμορφισμούς μας με άλλους καρκίνους και ασθένειες.

### 2.2.3 Αποτελέσματα

Συνολικά 760 πολυμορφισμοί, που προέρχονται από τη βάση της MelGene, επιλέχθηκαν ως υποψήφιοι γενετικοί τόποι για την πιθανή τους συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Συνολικά, εξαιρέθηκαν από την ανάλυση 655 πολυμορφισμοί οι οποίοι δεν κατάφεραν να ξεπεράσουν την τιμή όριο  $P < 9.1 \times 10^{-5}$  που προτάθηκε από την FDR διόρθωση. Μετά την αφαίρεση των διπλοεγγραφών, παρέμειναν 48 πολυμορφισμοί για περαιτέρω έρευνα. Στη συνέχεια, αποκλείστηκαν 40 υποψήφιοι πολυμορφισμοί που είχαν προηγουμένως συσχετιστεί σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (31, 44) ή με φαινότυπους στενά συνδεδεμένους με το μελάνωμα (πχ. αριθμός σπύλων ή χαρακτηριστικά μελάγχρωσης) (120, 121). Τέλος, μετά την εξάλειψη των πολυμορφισμών που ήταν σε ανισορροπία διασύνδεσης με τους ήδη γνωστούς γενετικούς τόπους ( $r^2 > 0.3$ ) καταλήξαμε στον πολυμορφισμό rs909253 (+252 G / A) στο γονίδιο Lymphotoxin Alpha (LT-alpha or TNF-beta).

Κατά τη διαδικασία του ποιοτικού ελέγχου στις μελέτες επικύρωσης, συνολικά 19 και 9 άτομα από το ελληνικό και κυπριακό δείγμα αντίστοιχα, δεν γονοτυπήθηκαν επιτυχώς και αφαιρέθηκαν από την ανάλυση. Όλοι οι πληθυσμοί επικύρωσης ήταν σε ισορροπία

Hardy-Weinberg. Συνολικά 2,871 περιπτώσεις μελανώματος και 349,984 μάρτυρες από την UK Biobank, 758 περιπτώσεις μελανώματος και 738 μάρτυρες από την Ελλάδα και 31 περιπτώσεις μελανώματος και 193 μάρτυρες από την Κύπρο συμπεριλήφθηκαν στην τελική ανάλυση, αποτελώντας ένα συνολικό δείγμα από 3,660 περιπτώσεις μελανώματος και 350,915 υγιείς μάρτυρες.

Συνολικά, η μετα-ανάλυση των 11 GWAS για τη σύγκριση του αλληλομόρφου G έναντι του A έδειξε μια προστατευτική επίδραση του αλληλομόρφου G ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (ΛΑ: 0.921; 95% ΔΕ: 0.887, 0.957;  $P$ :  $2.7 \times 10^{-5}$ ) χωρίς ετερογένεια μεταξύ των μελετών ( $I^2=0\%$ ) (Πίνακας 10). Τα δείγματα επικύρωσης από την UK Biobank και την Ελλάδα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές επιδράσεις (ΛΑ: 0.965; 95% ΔΕ: 0.914, 1.019;  $P$ : 0.318 και ΛΑ: 0.898; 95% ΔΕ: 0.757, 1.066;  $P$ : 0.218 αντίστοιχα). Μη-σημαντική επίδραση προς την αντίθετη κατεύθυνση έδειξε το κυπριακό δείγμα (ΛΑ: 1.320; 95% ΔΕ: 0.730, 2.388;  $P$ : 0.359).

Πίνακας 10. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της GWAS μετα-ανάλυσης και των τριών μελετών επικύρωσης για τη συσχέτιση του rs909253 με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος

Πολυμορφισμός	Γενετικός τύπος	Μελέτη	Ασθενείς/ Μάρτυρες	ΛΑ (95% ΔΕ)	P τιμή	I <sup>2</sup>
rs909253 A>G <sup>a</sup>	6p21.33	<b>Μετα-Ανάλυση GWAS (Πληθυσμός Ανακάλυψης)</b>	<b>12,874/ 23,303</b>	<b>0.921 (0.887, 0.957)</b>	<b>2.7 x 10<sup>-5</sup></b>	<b>0 %</b>
		Πληθυσμός επικύρωσης UKBB	2,871/ 349,984	0.965 (0.914, 1.019)	0.198	.
		Πληθυσμός επικύρωσης Ελλάδας	758/738	0.898 (0.757, 1.066)	0.218	.
		Πληθυσμός επικύρωσης Κύπρου	31/193	1.320 (0.730, 2.388)	0.359	.
		<b>Συνολικός Πληθυσμός επικύρωσης</b>	<b>3,660/ 350,915</b>	<b>0.961 (0.913, 1.012)</b>	<b>0.131</b>	<b>0 %</b>
		<b>Μετα-Ανάλυση</b>	<b>16,534/ 374,218</b>	<b>0.935 (0.907, 0.965)</b>	<b>1.95 x 10<sup>-5</sup></b>	<b>39.8 %</b>

Συντομογραφίες: ΛΑ=Λόγος Αναλογιών, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης.

<sup>a</sup> Μείζον>Ελάσσον αλληλόμορφο

Η μετα-ανάλυση των μελετών επικύρωσης κατέληξε σε ίδιας κατεύθυνσης επίδραση με την αρχική GWAS μετα-ανάλυση, αλλά όχι στατιστικά σημαντική (ΛΑ: 0.961; 95% ΔΕ: 0.913, 1.012; P: 0.131). Οι εκτιμητές των πληθυσμών επικύρωσης καταγράφονται στον Πίνακα 10. Η συνολική μετα-ανάλυση που συνέθεσε τον εκτιμητή πληθυσμών ανακάλυψης με τον συνολικό εκτιμητή των πληθυσμών επικύρωσης κατέληξε σε παρόμοια αποτελέσματα με την αρχική GWAS μετα-ανάλυση, αλλά απέτυχε να φτάσει σε σημαντικότητα ευρυ-γονιδιωματικού επιπέδου (ΛΑ: 0.935; 95% ΔΕ: 0.907, 0.965; P: 1.95x10<sup>-5</sup>, I<sup>2</sup>=39.8%).

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης σε eQTL βάσεις δεδομένων για το rs909253 έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός αυτός στο TNF γονίδιο συσχετίζεται ισχυρά με τον ιστό του περιφερικού αίματος (P: 1.14x10<sup>-11</sup>) (122), αλλά όχι με κάποιον κυτταρικό τύπο που εμπλέκεται στη βιολογία του μελανώματος. Η αναζήτηση για GWAS που συσχετίζουν το rs909253 σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με άλλους καρκίνους δεν

κατέληξε σε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα. Σημαντικές συσχετίσεις για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό εντοπίστηκαν για την ρευματοειδή αρθρίτιδα ( $P:9.8 \times 10^{-9}$ , πληθυσμός Ασιατικής καταγωγής) (123) και για την ηλικία της εμμηνόπαυσης ( $P: 3.6 \times 10^{-8}$ ) (124).

#### 2.2.4 Συζήτηση

Στην μελέτη αυτή προσπαθήσαμε να ανακαλύψουμε νέους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας ενσωματώνοντας όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες που προέρχονται από τις GWAS που έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα. Η προσέγγιση αυτή έχει εφαρμοστεί σε άλλα πεδία όπου έχουν αναδειχθεί νέοι γενετικοί τόποι, οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν από τις αρχικές GWAS, κυρίως λόγω προβλημάτων ισχύος (125, 126). Μετά την αξιολόγηση των υποψήφιων γονιδίων που αναφέρονται στη βάση δεδομένων MeIGene, καταλήξαμε σε έναν πολυμορφισμό (rs909253) για περαιτέρω αξιολόγηση σε μελέτες επικύρωσης. Παρά το γεγονός πως οι μελέτες επικύρωσης από την UK Biobank, την Ελλάδα και την Κύπρο κατέληξαν σε εκτιμητές επίδρασης παρόμοιους με την αρχική GWAS μετα-ανάλυση απέτυχαν να δείξουν σημαντικότητα σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο. Δεδομένου του μικρού μεγέθους επίδρασης, μεγαλύτερες μελέτες γενετικής συσχέτισης απαιτούνται ώστε να αποδειχθεί εάν το αποτέλεσμα της επίδρασης αυτού του πολυμορφισμού στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος είναι ένα ψευδώς θετικό σήμα ή εάν έχει μια πραγματική αλλά μικρή επίδραση στον κίνδυνο αυτό.

Το γονίδιο Lymphotoxin-alpha (LT-alpha ή TNF-beta) είναι μέλος της οικογένειας του TNF, ενός παράγοντα νέκρωσης όγκων και διαμεσολαβεί στον ανθρώπινο οργανισμό μέσα από φλεγμονώδεις, ανοσοδιεγερτικές και αντι-ιικές αποκρίσεις (127). Το γονίδιο LTA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p21.3 και ο λειτουργικός πολυμορφισμός στη θέση +252 (G / A) στο ιντρόνιο του LTA, που χαρακτηρίζεται ως rs909253, σχετίζεται με την υπερέκφραση TNF-beta (128). Οι βάσεις δεδομένων του eQTL υποδηλώνουν ότι το rs909253 δεν ρυθμίζει την έκφραση του TNF σε κάποιον κυτταρικό τύπο που εμπλέκεται στη βιολογία του μελανώματος. Ο πολυμορφισμός αυτός έχει εμπλακεί σε πολλούς τύπους καρκίνων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού (129), του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (130), του καρκίνου του στομάχου (131), του αδενοκαρκινώματος και αιματολογικά καρκινώματα (132). Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχουν GWAS που να έχουν επιβεβαιώσει τη συσχέτιση του γενετικού αυτού τόπου με τους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου. Όσο αφορά το μελάνωμα, μια μελέτη υποψήφιων γονιδίων με 141 περιπτώσεις μελανώματος



και 220 μάρτυρες προσπάθησε να αποσαφηνίσει την πιθανή συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (133). Ωστόσο, αν και η κατεύθυνση της επίδρασης αυτής της μελέτης είναι σύμφωνη με τη συνδυασμένη μετα-ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, δεν επιτυγχάνεται στατιστική σημαντικότητα ( $P=0.258$ ).

Για τον επιλεγμένο πολυμορφισμό, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές εκτιμήσεις σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο σημαντικότητας παρόλο που περισσότερες από 16,000 περιπτώσεις μελανώματος συγκεντρώθηκαν και παρά το πιο ανεκτικό κατώτατο όριο σημαντικότητας που επέτρεψε η αρχική ανάλυση. Είναι ήδη γνωστό πως οι μελέτες υποψήφιου γονιδίου με μικρά μεγέθη δείγματος δεν έχουν συνήθως την ισχύ να εντοπίσουν τις ασθενείς έως μέτριες γενετικές επιδράσεις που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Η προσέγγισή μας αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα πως κανένα από τα υποψήφια για συσχέτιση με το μελάνωμα γονίδια που έχουν αναφερθεί έως τώρα δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο αυτό σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας. Το αποτέλεσμα αυτό δημιουργεί την ανάγκη δημιουργίας μεγαλύτερων μελλοντικών μελετών και καλύτερης συνεργασίας μεταξύ των κοινοπραξιών προκειμένου να διασαφηνιστεί η γενετική αρχιτεκτονική του μελανώματος.

Η μελέτη αυτή είχε σαν στόχο να εντοπιστούν πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, ενσωματώνοντας υποψήφια γονίδια από μελέτες που είχαν ήδη πραγματοποιηθεί και χρησιμοποιώντας ήδη υπάρχοντα δεδομένα από GWAS. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι κανένα από τα προηγούμενα υποψήφια γονίδια για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος δεν φαίνεται σχετίζεται με τον κίνδυνο αυτό και είναι πιθανό ότι τα αποτελέσματα αυτών των μελετών από τις οποίες προήλθαν να υπερεκτιμώνται τακτικά. Θα πρέπει να αποφευχθούν μελλοντικές μελέτες υποψήφιου γονιδίου πάνω σε αυτούς τους πολυμορφισμούς ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, ώστε να περιοριστεί η σπατάλη χρόνου και πόρων και το ενδιαφέρον θα πρέπει να μετατοπιστεί σε μεγαλύτερες GWAS.

## **2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ, ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΜΕΛΑΝΩΜΑ**

### **2.3.1 Εισαγωγή-Σκοπός**

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες παραγράφους (παράγραφοι 1.1.3, 2.1.1), η ανάπτυξη του μελανώματος οφείλεται στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών εκθέσεων, με κυριότερη την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (26, 27, 134), φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (24, 25) και γενετικών παραγόντων (31, 92, 93).

Σκοπός της μελέτης είναι να εξεταστεί κατά πόσο η αλληλεπίδραση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και η γενετική προδιάθεση μεταβάλλει τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Πιο συγκεκριμένα η εξέταση της υπόθεσης κατά πόσο ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε άτομα που έχουν την γενετική προδιάθεση μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.

### **2.3.2 Μεθοδολογία**

#### **Πλυθυσμός της Μελέτης**

Μελετήθηκαν συμμετέχοντες της βιοτράπεζας UK Biobank (75). Οι συμμετέχοντες αυτοί, παρακαλουθήθηκαν από κέντρα αξιολόγησης στα οποία καταγράφηκαν, κατά την ένταξή τους στη βιοτράπεζα, στοιχεία σχετικά με τον τρόπο ζωής τους, το περιβάλλον, το ιατρικό ιστορικό και τη σύνθεση του σώματος τους χρησιμοποιώντας ερωτηματολόγια με οθόνη αφής, συνεντεύξεις και φυσικές μετρήσεις. Για την παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα υποσύνολο του πληθυσμού της βιοτράπεζας UK Biobank, οι οποίοι ήταν μη συγγενικά άτομα, ευρωπαϊκής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, αποκλείστηκαν άτομα χωρίς διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, άτομα με μη ευρωπαϊκή καταγωγή και με τη χρήση των κεντρικά παρεχόμενων δεδομένων συγγενείας της UK Biobank, αποκλείστηκαν οποιαδήποτε ζεύγη συγγενών 1ου και 2ου βαθμού.

## Έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία

Η UK Biobank συγκέντρωσε εκτενείς πληροφορίες σχετικά με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων της, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από ερωτηματολόγια και φυσικές μετρήσεις για ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών εκθέσεων (75). Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία αξιολογήθηκε βάση ενός ερωτηματολογίου με οθόνη αφής στο οποίο οι συμμετέχοντες κατέγραψαν την απάντησή τους στην ερώτηση "Σε μια τυπική μέρα το καλοκαίρι, πόσες ώρες ξοδεύεις σε εξωτερικούς χώρους;". Πιθανές απαντήσεις για τους συμμετέχοντες στην παραπάνω ερώτηση ήταν ο αριθμός των ωρών που σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους και οι επιλογές "Λιγότερο από μία ώρα την ημέρα", "Δεν γνωρίζω" και "Προτιμώ να μην απαντήσω" (Εικόνα 9). Συμμετέχοντες με χαμηλή έκθεση θεωρήθηκαν όσοι σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους λιγότερες από τη διάμεση τιμή ώρες και σαν συμμετέχοντες με υψηλή έκθεση όσοι σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους περισσότερες από τη διάμεση τιμή.

In a typical DAY in summer, how many hours do you spend outdoors?

hours

7 8 9 Clear

4 5 6 Less than an hour a day

1 2 3 Do not know

0 Prefer not to answer

Εικόνα 9. Εικόνα από το ερωτηματολόγιο με οθόνη αφής της UK Biobank.

Πηγή δεδομένων: UK Biobank, <http://biobank.ctsu.ox.ac.uk/crystal/refer.cgi?id=100275>

## Περιστατικά μελανώματος

Δεδομένα για τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου ήταν διαθέσιμα για κάθε συμμετέχοντα μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Εντοπίστηκαν 2,862 μη συγγενικά άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής με διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, των οποίων η πρωτογενής διάγνωση καρκίνου ήταν μελάνωμα σύμφωνα με τους κώδικούς ICD-9 (172) και ICD-10 (C43). Από την ανάλυση αποκλείστηκαν οι συμμετέχοντες με διάγνωση μελανώματος πριν από την εισαγωγή τους στη βιοτράπεζα (N=1,852). Από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες της UK Biobank επιλέχθηκαν 321,568 υγιείς μάρτυρες οι οποίοι δεν είχαν ποτέ διαγνωσθεί με καρκίνο ή είχαν αναφέρει την ύπαρξη καρκίνου μέσω αυτοαναφοράς και δεν είχαν καταχωρηθεί ποτέ στο εθνικό μητρώο καρκίνου. Σαν διάρκεια παρακολούθησης (follow-up) ορίστηκε ο χρόνος από την ημερομηνία ένταξης στη βιοτράπεζα μέχρι την εμφάνιση μελανώματος για τα περιστατικά μελανώματος και ως την 31<sup>η</sup> Μαρτίου 2015 για τους υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο. Ως εκ τούτου, στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 322,578 συμμετέχοντες. Μεταξύ αυτών υπήρχαν 1,010 νέα περιστατικά μελανώματος.

## Γονοτύπηση

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.2 τα δεδομένα της UK Biobank περιέχουν γονότυπους για 488,377 συμμετέχοντες. Από αυτούς, 438,427 άτομα έχουν γονοτυπηθεί σε 825,427 πολυμορφισμούς από το Affymetrix UK Biobank Axiom Array chip ενώ οι υπόλοιποι 49,950 γονοτυπήθηκαν σε 807,411 πολυμορφισμούς από το Affymetrix Affymetrix UK BiLEVE Axiom Array chip της μελέτης UK BiLEVE (112). Η καταγραφή των μη τυποποιημένων πολυμορφισμών (imputation) πραγματοποιήθηκε κεντρικά από την UK Biobank χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα αναφοράς που συγχώνευσε τις πλατφόρμες UK10K and 1000 Genomes Phase 3 καθώς επίσης και την Haplotype Reference Consortium (HRC) πλατφόρμα (113). Ανάλυση κυρίων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε κεντρικά από την UK Biobank για να αξιολογηθεί η πληθυσμιακή διαστρωμάτωση.

## Γενετικός Δείκτης Κινδύνου

Ένας σταθμισμένος γενετικός δείκτης κινδύνου (ΓΔΚ) υπολογίστηκε με βάση τους γενετικούς πολυμορφισμούς που αναφέρθηκαν προηγουμένως και οι οποίοι εμφάνισαν

στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ευρυγονιδιωματικό επίπεδο στην πρόσφατη μετα-ανάλυση των 11 GWAS (44) (n=20 πολυμορφισμοί). Ο ΓΔΚ αντιπροσωπεύει ένα άθροισμα του αριθμού των αλληλομόρφων κινδύνου σταθμισμένο από τους εκτιμητές επίδρασής τους (εκτιμητές beta). Οι εκτιμητές αυτοί προήλθαν από τις ανεξάρτητες πηγές που περιγράφηκαν νωρίτερα (44) (Πίνακας 11). Κάθε ΓΔΚ τυποποιήθηκε ανά μονάδα αύξησης στον πληθυσμό των μαρτύρων. Ο πληθυσμός της ανάλυσης χωρίστηκε σε δύο ομάδες α) υψηλού και β) χαμηλού γενετικού κινδύνου, με βάση τη διάμεση τιμή του ΓΔΚ

**Πίνακας 11. Εκτιμητές επίδρασης των αλληλομόρφων κινδύνου των 20 πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο.**

Πολυμορφισμός	Πλησιέστερο Γονίδιο	Αλληλόμορφο Κινδύνου	Συχνότητα Αλληλομόρφου Κινδύνου	Εκτιμητές Επίδρασης
rs12410869	ARNT/SETDB1	G	0.63	0.130
rs1858550	PARP1	C	0.66	0.143
rs6750047	RMDN2 (CYP1B1)	A	0.43	0.088
rs7582362	CASP8	A	0.27	0.113
rs380286	TERT/CLPTM1L	A	0.44	0.152
rs250417	SLC45A2	C	0.97	0.891
rs6914598	CDKAL1	C	0.32	0.108
rs1636744	AGR3	T	0.40	0.105
rs7852450	CDKN2A/MTAP	T	0.52	0.212
rs10739221	TMEM38B (RAD23B, TAL2)	T	0.24	0.120
rs2995264	OBFC1	G	0.09	0.144
rs498136	CCND1	A	0.32	0.116
rs1393350	TYR	A	0.27	0.198
rs73008229	ATM	G	0.86	0.188
rs4778138	OCA2	A	0.84	0.180
rs12596638	FTO	A	0.16	0.143
rs75570604	MC1R	C	0.08	0.600
rs6088372	ASIP	T	0.14	0.267
rs408825	MX2	T	0.60	0.141
rs2092180	PLA2G6	A	0.53	0.116

### Στατιστική Ανάλυση

Η συσχέτιση του ΓΔΚ και της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία (καθώς και του συνδυασμού τους) ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας μοντέλα αναλογικού κινδύνου Cox με τη διάρκεια της παρακολούθησης ως χρονική μέτρηση και υπολογίστηκαν οι Λόγοι Σχετικού Κινδύνου (ΛΣΚ) και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους (95% ΔΕ). Οι αναλύσεις προσαρμόστηκαν ως προς την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την

παιδική ηλικία και φαινοτυπικούς παράγοντες όπως το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος. Στην περίπτωση που έλειπαν οι τιμές των προγνωστικών αυτών παραγόντων, δημιουργήθηκε μια μεταβλητή-δείκτης η οποία δήλωνε την έλλειψη τιμής και ενσωματώθηκε στο μοντέλο σαν ανεξάρτητη μεταβλητή.

Η συσχέτιση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος πραγματοποιήθηκε στρωματοποιώντας ως προς την γενετική προδιάθεση. Πιο αναλυτικά, διερευνήθηκε η συσχέτιση της ηλιακής ακτινοβολίας με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος χωριστά για τα άτομα με υψηλό γενετικό κίνδυνο και για τα άτομα με χαμηλό γενετικό κίνδυνο. Αξιολογήθηκε επίσης η συσχέτιση αυτή σε υποομάδες ανάλογα με την συχνότητα χρήσης ηλιακής προστασίας (αντιηλιακό, καπέλο) και την ηλικιακή ομάδα στην οποία άνηκαν οι συμμετέχοντες. Σαν ανάλυση ευαισθησίας, εξετάστηκε η συσχέτιση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος μόνο για ιστολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις επιφανειακώς επεκτεινόμενου μελανώματος μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Stata 14 (StataCorp, 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.) και η κατασκευή του ΓΔΚ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το PLINK 2.00 (<https://www.cog-genomics.org/plink/2.0/>) (117).

### 2.3.3 Αποτελέσματα

Το δείγμα των 322,578 συμμετεχόντων της ανάλυσης αποτελούνταν από 168,483 γυναίκες (52.39%) και 154,095 άνδρες (47.61%), με μέση ηλικία κατά την ένταξή τους στη βιοτράπεζα τα 56,08 έτη. Η μέση χρονική διάρκεια παρακολούθησης ήταν τα 6.12 έτη. Οι 1,010 ασθενείς με μελάνωμα είχαν μέση ηλικία 58.47 έτη και αποτελούνταν από 509 (50.4%) γυναίκες και τα 321,246 άτομα χωρίς καρκίνο είχαν μέση ηλικία 56,07 έτη και περιελάμβαναν 167,974 (52,24%) γυναίκες. Ο μέσος χρόνος έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία κατά τους καλοκαιρινούς μήνες ήταν 4.04 ώρες/ημέρα για τους ασθενείς με μελάνωμα και 3.77 ώρες/ημέρα για τους υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο. Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία ανά ομάδα γενετικού κινδύνου (χαμηλού ή υψηλού). Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά, οι ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και οι φαινοτυπικοί παράγοντες για το σύνολο του δείγματος, καθώς και για

τους ασθενείς με μελάνωμα και τους υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο ξεχωριστά παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 12. Ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία στις υποομάδες γενετικού κινδύνου**

	Χαμηλός ΓΔΚ			Υψηλός ΓΔΚ		
	Σύνολο δείγματος (N=161,434)	Περιστατικά Μελανώματος (N=355)	Υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο (N=161,079)	Σύνολο δείγματος (N= 161,144)	Περιστατικά Μελανώματος (N=655)	Υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο (N=160,489)
<b>Χρόνος έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, ώρες/ημέρα,</b>						
<b>Μέση τιμή (τ.α),</b>	3.78 (2.38),	3.94 (2.49),	3.78 (2.38),	3.76 (2.40),	4.09 (2.46),	3.76 (2.40),
<b>Διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)</b>	3 (2-5)	3 (2-5)	3 (2-5)	3 (2-5)	4 (2-6)	3 (2-5)
τ.α: τυπική απόκλιση						



Πίνακας 13. Περιγραφικά χαρακτηριστικά, ώρες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και φαινοτυπικοί παράγοντες

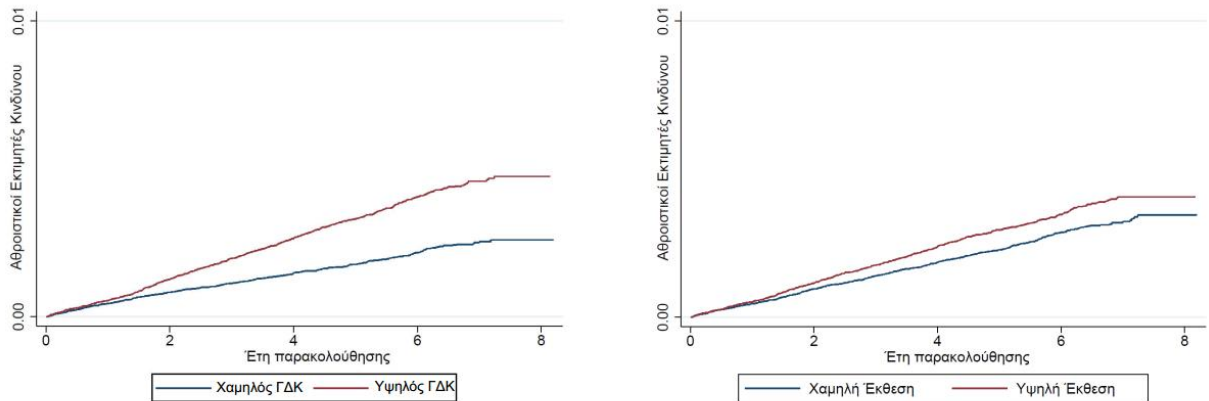
Χαρακτηριστικά	Σύνολο δείγματος (N=322,578)	Περιστατικά Μελανώματος (N=1,010)	Υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο (n=321,568)
Γυναίκες, N (%)	168,483 (52.39)	509 (50.40)	167,974 (52.24)
Ηλικία, μέση τιμή (τ.α) έτη	56.08 (8.00)	58.47 (7.60)	56.07 (8.00)
Χρονική διάρκεια παρακολούθησης, μέση τιμή (τ.α) έτη	6.12 (0.88)	3.10 (1.85)	6.13 (0.86)
Χρόνος έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, ώρες/ημέρα, Μέση τιμή (τ.α), Διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)	3.77 (2.39), 3 (2-5)	4.04 (2.47), 4 (2-5)	3.77 (2.39), 3 (2-5)
<b>Χρώμα δέρματος, N (%)</b>			
<i>Πολύ ανοιχτό</i>	24,617 (7.73)	99 (9.94)	24,518 (7.72)
<i>Ανοιχτό</i>	226,396 (71.06)	779 (78.21)	225,617 (71.04)
<i>Ελαφρώς σκούρο</i>	60,976 (19.14)	112 (11.24)	60,864 (19.16)
<i>Αρκετά σκούρο</i>	5,211 (1.64)	4 (0.40)	5,207 (1.64)
<i>Καφέ</i>	1,380 (0.43)	2 (0.20)	1,378 (0.43)
<i>Μαύρο</i>	29 (0.01)	0 (0)	29 (0.01)
<b>Ευκολία μαυρίσματος του δέρματος, N (%)</b>			
<i>Μεγάλη</i>	66,504 (21.04)	154 (15.45)	66,350 (21.05)
<i>Μέτρια</i>	129,069 (40.82)	391 (39.22)	128,678 (40.83)
<i>Ήπιο ή περιστασιακό μαύρισμα</i>	67,054 (21.21)	235 (23.57)	66,819 (21.20)
<i>Καθόλου μαύρισμα, μόνο κλαψιμο</i>	53,525 (16.93)	217 (21.77)	53,508 (16.91)
<b>Χρώμα μαλλιών (φυσικό), N (%)</b>			
<i>Ξανθό</i>	35,511 (11.03)	160 (15.86)	35,351 (11.01)
<i>Κόκκινο</i>	13,848 (4.30)	88 (8.72)	13,760 (4.29)
<i>Ανοιχτό καφέ</i>	129,763 (40.30)	431 (42.72)	129,332 (40.30)
<i>Σκούρο καφέ</i>	123,856 (38.47)	283 (28.05)	123,573 (38.50)
<i>Μαύρο</i>	15,093 (4.69)	27 (2.68)	15,066 (4.69)
<i>Άλλο</i>	3,900 (1.21)	20 (1.98)	3,880 (1.21)

<b>Χρήση αντηλιακής προστασίας, N (%)</b>			
<i>Ποτέ/Σπάνια</i>	27,335 (8.53)	64 (6.37)	27,271 (8.53)
<i>Κάποιες φορές</i>	109,584 (34.19)	295 (29.38)	109,289 (34.20)
<i>Περισσότερες φορές</i>	118,253 (36.89)	437 (43.53)	117,816 (36.87)
<i>Πάντα</i>	65,382 (20.40)	208 (20.72)	65,174 (20.40)
<b>Εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία (&lt;15 έτη), N (%)</b>			
<i>Ποτέ</i>	125,447 (51.74)	315 (42.40)	125,132 (51.76)
<i>1-4 φορές</i>	89,328 (36.83)	305 (41.04)	89,023 (36.82)
<i>&gt;=5 φορές</i>	27,701 (11.42)	123 (16.55)	27,578 (11.40)
τ.α: τυπική απόκλιση			

Ο ΓΔΚ σαν συνεχής μεταβλητή συσχετίστηκε ισχυρά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (ΛΣΚ=1.395 για κάθε μονάδα αύξησης της τυπικής απόκλισης,  $P=9.60 \times 10^{-26}$ ). Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία συσχετίστηκε επίσης σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (ΛΣΚ=1.029 για κάθε μονάδα αύξησης,  $P=0.027$ ) (Πίνακας 14). Η Εικόνα 10 παρουσιάζει τις διακυμάνσεις τους κινδύνου εμφάνισης μελανώματος κατά τη διάρκεια των ετών παρακολούθησης στις διαφορετικές ομάδες ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

#### Πίνακας 14. Συσχέτιση μεταξύ ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος

	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή	Σύνολο δείγματος	Περιστατικά μελανώματος
<b>ΓΔΚ, ανά μονάδα αύξησης της τυπικής απόκλισης</b>	1.377 (1.293, 1.467)	$2.062 \times 10^{-23}$	322,578	1,010
<b>Έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης (ώρες/ημέρα)</b>	1.029 (1.003, 1.057)	0.027	305,087	968
Συντομογραφίες: ΛΣΚ=Λόγος Σχετικού Κινδύνου, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης				
Ο εκτιμητής ΛΣΚ and το 95% ΔΕ προήλθαν απο μοντέλα παλινδρόμησης Cox. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μοντέλων για την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία, το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος				



**Εικόνα 10. Αθροιστικοί εκτιμητές κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος κατά τη διάρκεια των ετών παρακολούθησης στις διαφορετικές υποομάδες ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία**

Στην ομάδα υψηλού ΓΔΚ, κάθε επιπλέον ώρα έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος κατά 3,8% ( $\Lambda\Sigma\text{K}=1.038$  ανά μονάδα αύξησης,  $P=0.02$ ). Στην ίδια ομάδα συμμετεχόντων, παρατηρήθηκε αυξημένος σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος κατά 19.9% σε άτομα με υψηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία σε σύγκριση με άτομα με χαμηλή έκθεση ( $\Lambda\Sigma\text{K}=1.199$ ,  $P=0.028$ ) (Πίνακας 15). Στην ομάδα χαμηλού ΓΔΚ δεν εντοπίστηκαν παρόμοιες διαφορές ( $P=0.743$  και  $P=0.724$  αντίστοιχα).

**Πίνακας 15. Συσχέτισης μεταξύ ΓΔΚ και έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος**

	<b>ΛΣΚ (95% ΔΕ)</b>	<b>P τιμή</b>
<b>Χαμηλός ΓΔΚ (355 περιστατικά μελανώματος / 161,079 υγιείς μάρτυρες)</b>		
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	1.007 (0.962, 1.054)	0.743
Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	0.961 (0.772, 1.196)	0.724
<b>Υψηλός ΓΔΚ (655 περιστατικά μελανώματος / 160,489 υγιείς μάρτυρες)</b>		
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	1.038 (1.005, 1.072)	0.002
Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	1.199 (1.020, 1.410)	0.028
Συντομογραφίες: ΛΣΚ=Λόγος Σχετικού Κινδύνου, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης Ο εκτιμητής ΛΣΚ and το 95% ΔΕ προήλθαν απο μοντέλα παλινδρόμησης Cox. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μοντέλων για την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία, το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος		

Η ανάλυση υποομάδων, σχετικά με την ηλικία των συμμετεχόντων και τη χρήση αντιηλιακής προστασίας έδειξε παρόμοιες συσχετίσεις για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Πιο αναλυτικά, μεταξύ των συμμετεχόντων ηλικίας άνω των 50 ετών και υψηλού ΓΔΚ, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος είτε ως συνεχής μεταβλητή (ΛΣΚ=1.043 ανά μονάδα αύξησης,  $P=0.021$ ) είτε συγκρίνοντας υψηλή έναντι χαμηλής έκθεσης (ΛΣΚ=1.213,  $P=0.037$ ). Μεταξύ των συμμετεχόντων που χρησιμοποιούν τις περισσότερες φορές ή πάντα αντιηλιακή προστασία και υψηλού ΓΔΚ, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος είτε ως συνεχής μεταβλητή (ΛΣΚ=1.064 ανά μονάδα αύξησης,  $P=0.002$ ) είτε συγκρίνοντας την υψηλή προς τη χαμηλή έκθεση (ΛΣΚ=1.253,  $P=0.029$ ) (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Ανάλυση υποομάδων για τη συσχέτιση έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ανάλογα με τον γενετικό κίνδυνο σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες και διαφορετική χρήση αντιηλιακής προστασίας

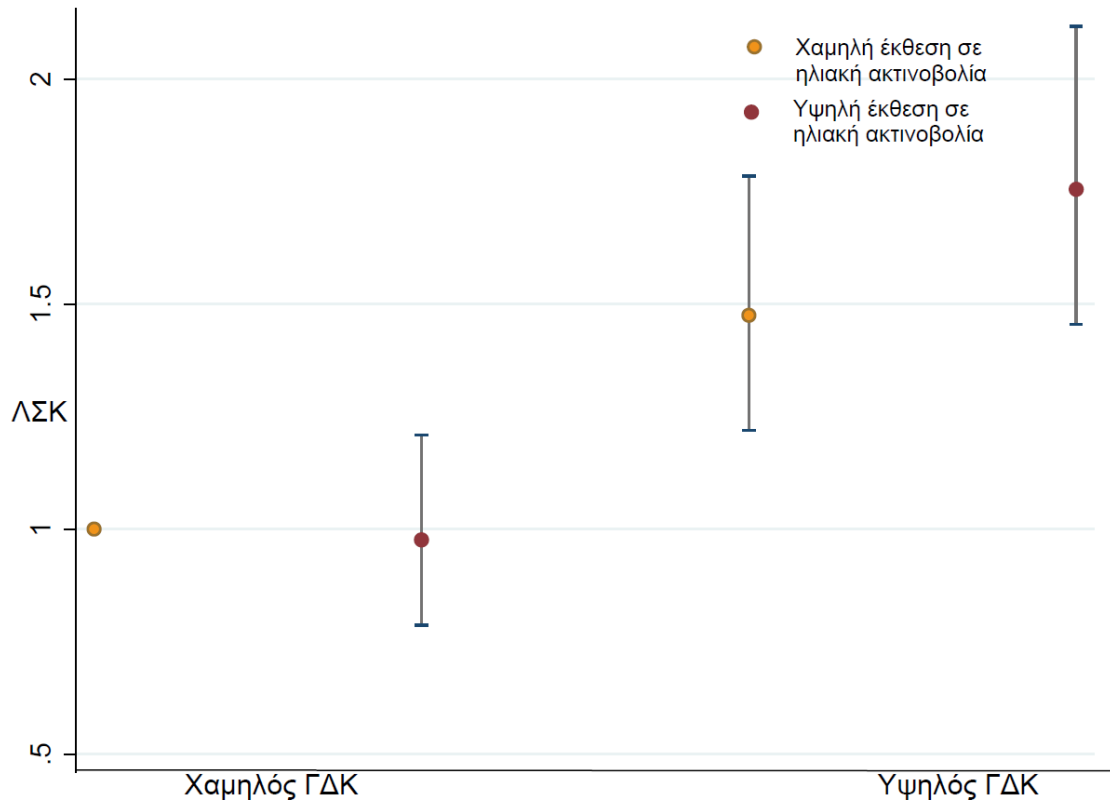
	Ηλικία ≤50 έτη (185 περιστατικά μελανώματος / 89,163 υγιείς μάρτυρες)		Ηλικία >50 έτη (825 περιστατικά μελανώματος / 232,405 υγιείς μάρτυρες)	
	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή
<b>Χαμηλός ΓΔΚ</b>				
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	0.952 (0.845, 1.072)	0.418	1.019 (0.969, 1.071)	0.455
Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	0.818 (0.474, 1.413)	0.473	0.993 (0.780, 1.263)	0.955
<b>Υψηλός ΓΔΚ</b>				
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	1.014 (0.940, 1.094)	0.710	1.043 (1.006, 1.080)	0.021
Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	1.097 (0.755, 1.594)	0.624	1.213 (1.012, 1.454)	0.037
	<b>Περισσότερη χρήση αντιηλιακής προστασία (645 περιστατικά μελανώματος / 182,990 υγιείς μάρτυρες)</b>		<b>Λιγότερη χρήση αντιηλιακής προστασία (359 περιστατικά μελανώματος / 136,560 υγιείς μάρτυρες)</b>	
	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή
<b>Χαμηλός ΓΔΚ</b>				
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	0.962 (0.902, 1.026)	0.247	1.061 (0.995, 1.131)	0.07
Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	0.853 (0.646, 1.127)	0.265	1.147 (0.801, 1.642)	0.452
<b>Υψηλός ΓΔΚ</b>				
Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία, ανά μονάδα αύξησης	1.064 (1.022, 1.107)	0.002	0.993 (0.941, 1.049)	0.822

Υψηλή vs. Χαμηλή έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία	1.252 (1.022, 1.533)	0.029	1.084 (0.824, 1.424)	0.563
Συντομογραφίες: ΛΣΚ=Λόγος Σχετικού Κινδύνου, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης Ο εκτιμητής ΛΣΚ and το 95% ΔΕ προήλθαν από μοντέλα παλινδρόμησης Cox. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μοντέλων για την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία, το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος				

Ερευνώντας τις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, τα άτομα με υψηλού ΓΔΚ παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε σύγκριση με άτομα με χαμηλού ΓΔΚ. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα με υψηλό ΓΔΚ και υψηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία παρουσίασαν 75.5% μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (ΛΣΚ=1.755,  $P=3.86 \times 10^{-9}$ ), σε σύγκριση με άτομα με χαμηλό ΓΔΚ και χαμηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (ομάδα αναφοράς). Τα άτομα με υψηλό ΓΔΚ και χαμηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία εμφάνισαν 47.5% υψηλότερο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος (ΛΣΚ=1.475,  $P=6.33 \times 10^{-5}$ ), σε σύγκριση με άτομα με χαμηλό ΓΔΚ και χαμηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (ομάδα αναφοράς) (Πίνακας 17, Εικόνα 11). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη σύγκριση των ατόμων υψηλού γενετικού κινδύνου (υψηλή ή/και χαμηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία) σε σύγκριση με τα άτομα με χαμηλό γενετικό κίνδυνο και υψηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.

#### Πίνακας 17. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου

		ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή
<b>ΓΔΚ</b>	<b>Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία</b>		
Χαμηλός	Χαμηλή (ομάδα αναφοράς)	.	.
	Υψηλή	0.976 (0.787, 1.209)	0.826
Υψηλός	Χαμηλή	1.475 (1.219, 1.784)	$6.33 \times 10^{-5}$
	Υψηλή	1.755 (1.455, 2.117)	$3.86 \times 10^{-9}$
Συντομογραφίες: ΛΣΚ=Λόγος Σχετικού Κινδύνου, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης Ο εκτιμητής ΛΣΚ and το 95% ΔΕ προήλθαν από μοντέλα παλινδρόμησης Cox. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μοντέλων για την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία, το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος			



**Εικόνα 11.** Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου

Η ανάλυση υποομάδων, σχετικά με την ηλικία των συμμετεχόντων και τη χρήση αντιηλιακής προστασίας εντός των συνδυασμένων υποομάδων έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και ΓΔΚ έδειξε παρόμοιες συσχετίσεις για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος με την ανάλυση του συνολικού δείγματος, με ελαφρώς υψηλότερες εκτιμήσεις για τους συμμετέχοντες ηλικίας κάτω των 50 ετών και για τους συμμετέχοντες με λιγότερη χρήση αντιηλιακής προστασίας (Πίνακας 18, Εικόνες 12, 13).

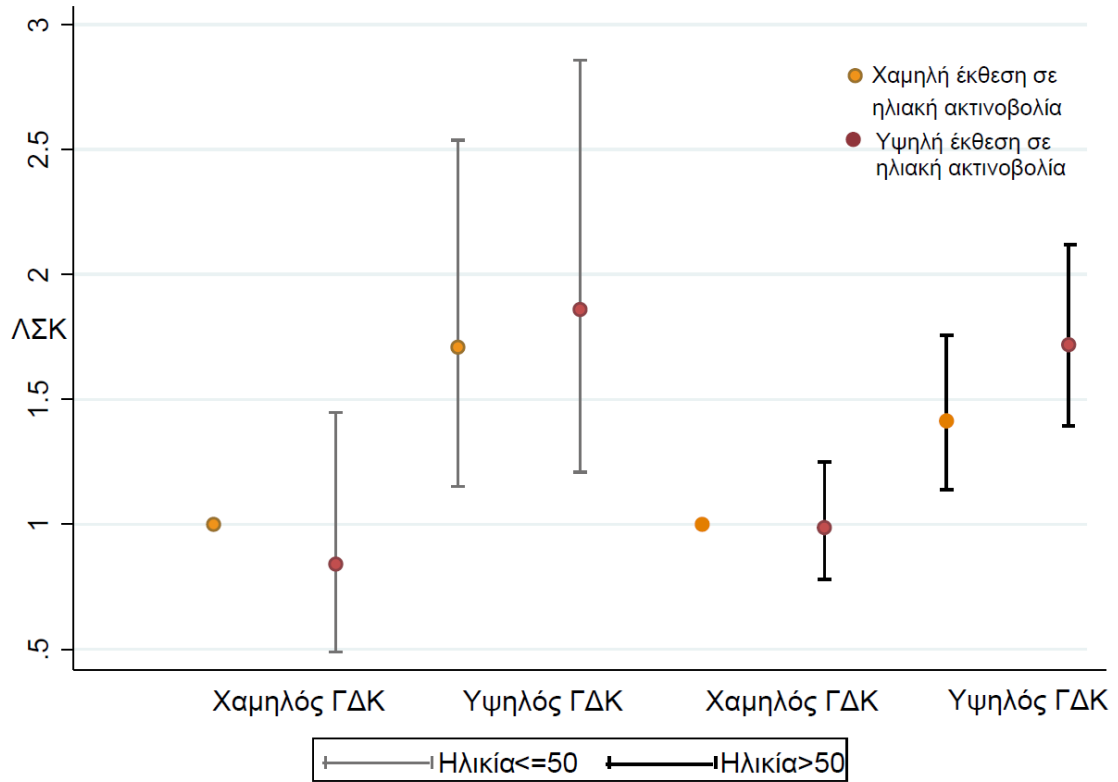
**Πίνακας 18. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς την ηλικιακή ομάδα και τη χρήση αντιηλιακής προστασίας των συμμετεχόντων**

		Ηλικία ≤50 έτη (185 περιστατικά μελανώματος / 89,163 υγιείς μάρτυρες)		Ηλικία >50 έτη (825 περιστατικά μελανώματος / 232,405 υγιείς μάρτυρες)	
		ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή
<b>ΓΔΚ</b>	<b>Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία</b>				
Χαμηλός	Χαμηλή (ομάδα αναφοράς)	.	.	.	.
	Υψηλή	0.841 (0.489, 1.447)	0.532	0.987 (0.780, 1.250)	0.918
Υψηλός	Χαμηλή	1.709 (1.152, 2.537)	0.008	1.414 (1.138, 1.757)	0.002
	Υψηλή	1.860 (1.210, 2.858)	0.005	1.719 (1.394, 2.119)	3.77x10 <sup>-7</sup>
		<b>Περισσότερη χρήση αντιηλιακής προστασία (645 περιστατικά μελανώματος / 182,990 υγιείς μάρτυρες)</b>		<b>Λιγότερη χρήση αντιηλιακής προστασία (359 περιστατικά μελανώματος / 136,560 υγιείς μάρτυρες)</b>	
		ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή	ΛΣΚ (95% ΔΕ)	P τιμή
<b>ΓΔΚ</b>	<b>Έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία</b>				
Χαμηλός	Χαμηλή (ομάδα αναφοράς)	.	.	.	.
	Υψηλή	0.883 (0.672, 1.160)	0.374	1.144 (0.804, 1.627)	0.452
Υψηλός	Χαμηλή	1.373 (1.082, 1.740)	0.009	1.706 (1.236, 2.355)	0.001
	Υψηλή	1.683 (1.333, 2.123)	1.13x10 <sup>-5</sup>	1.856 (1.347, 2.557)	1.5x10 <sup>-4</sup>

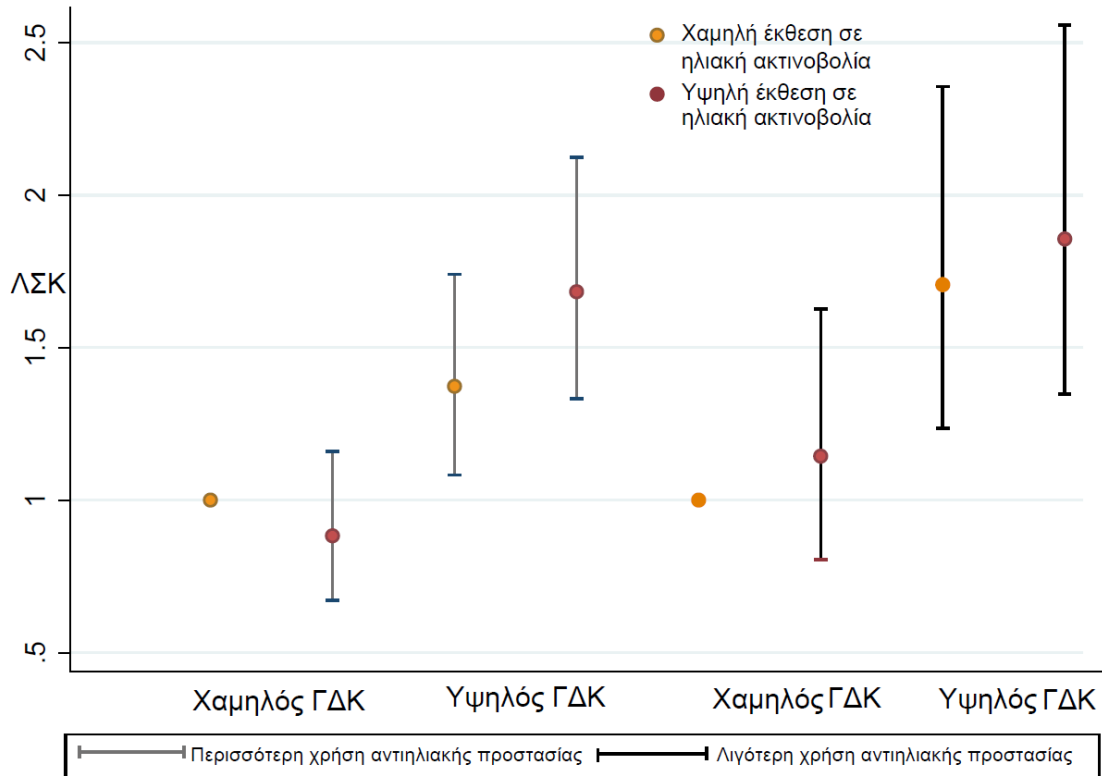
Συνομογραφίες: ΛΣΚ=Λόγος Σχετικού Κινδύνου, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης

Ο εκτιμητής ΛΣΚ and το 95% ΔΕ προήλθαν απο μοντέλα παλινδρόμησης Cox. Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μοντέλων για την ηλικία, το φύλο, τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, τα ηλιακά εγκαύματα κατά την παιδική ηλικία, το χρώμα του δέρματος, το χρώμα των μαλλιών και την ευκολία του μαυρίσματος του δέρματος



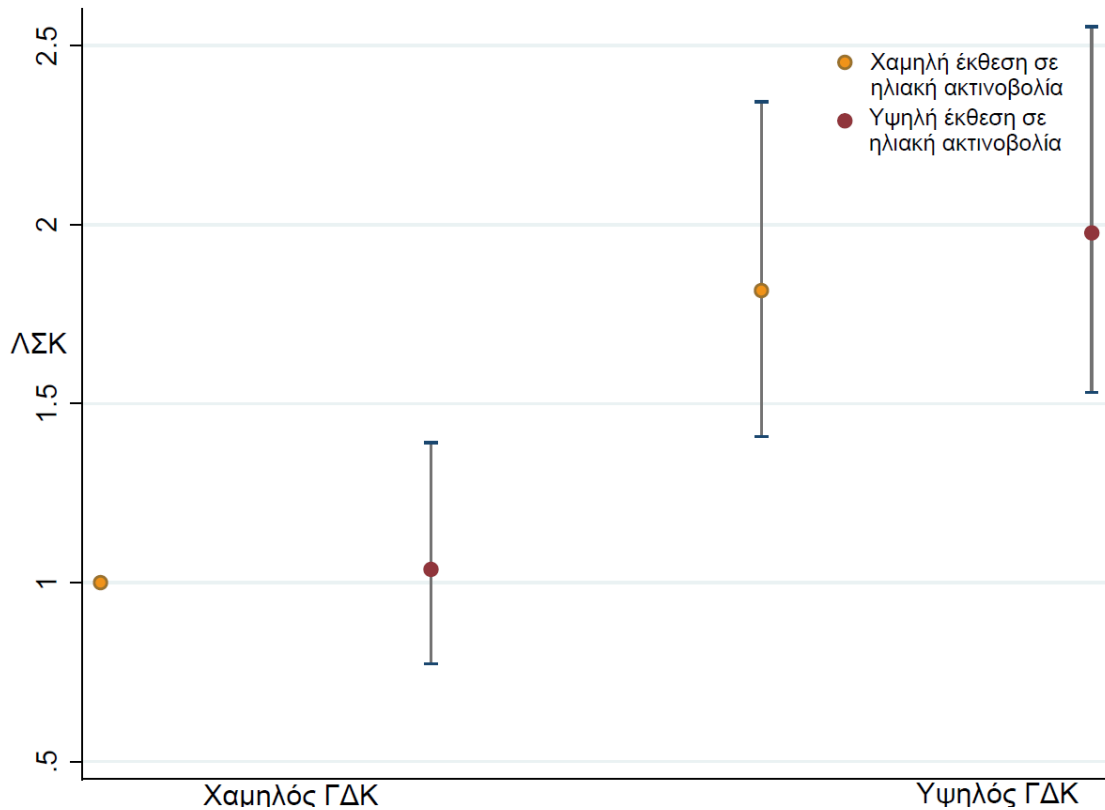


Εικόνα 12. Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς την ηλικία των συμμετεχόντων



**Εικόνα 13.** Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου, στρωματοποιώντας ως προς τη χρήση αντιηλιακής προστασίας

Η ανάλυση ευαισθησίας, στην οποία ως περιστατικά μελανώματος θεωρήθηκαν μόνο οι συμμετέχοντες με ιστολογικά επιβεβαιωμένο επιφανειακώς επεκτεινόμενο μελάνωμα (N=579), δεν κατέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τη συσχέτιση μεταξύ έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος για συμμετέχοντες με υψηλό ΓΔΚ. Στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και ΓΔΚ, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με την ανάλυση σε όλο το δείγμα (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14.** Κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος στις συνδυασμένες υποομάδες έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικού κινδύνου θεωρώντας σαν περιπτώσεις μελανώματος μόνο τις ιστολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις επιφανειακώς επεκτεινόμενου μελανώματος

### 2.3.4 Συζήτηση

Στην παραπάνω μελέτη των 322,578 συμμετεχόντων, παρατηρήθηκε πως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, που εκτιμήθηκε από τον χρόνο σε ώρες που δαπανήθηκε σε εξωτερικούς χώρους κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, και η γενετική προδιάθεση επηρεάζουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Η επίδραση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία πάνω στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ήταν ακόμα ισχυρότερη στους συμμετέχοντες που είχαν υψηλό ΓΔΚ. Δεν εντοπίστηκε παρόμοια σχέση στα άτομα που δεν έχουν επιβαρυσμένο γενετικό υπόβαθρο, όπου ο κίνδυνος παρέμεινε σταθερός.

Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής, ότι δηλαδή ένας γενετικός δείκτης κινδύνου αποτελούμενος από 20 πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (44) έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν κατασκευάσει αντίστοιχους δείκτες για το γενετικό κίνδυνο μελανώματος (105, 107, 114, 135). Τέτοια

ευρήματα ενισχύουν την πεποίθηση πως οι γενετικοί παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και είναι σταθεροί στο χρόνο, μπορούν να μεταβάλλουν τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.

Η ανάλυσή μας έδειξε πως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, ορισμένη σαν το χρόνο σε ώρες ανά ημέρα που καταναλώνει κάποιος σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σχετίζεται θετικά σημαντικά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ( $\Lambda\Sigma K=1.029$ ; 95% ΔΕ: 1.003, 1.057). Η συσχέτιση ήταν ισχυρότερη στους συμμετέχοντες υψηλού ΓΔΚ ( $\Lambda\Sigma K=1.038$ ; 95% ΔΕ: 1.005, 1.072). Μεταξύ των συμμετεχόντων με υψηλό ΓΔΚ παρατηρήθηκε επίσης ένας σχεδόν 20% υψηλότερος σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος για εκείνους που πέρασαν πάνω από 3 ώρες την ημέρα σε εξωτερικούς χώρους τους καλοκαιρινούς μήνες σε σύγκριση με εκείνους που πέρασαν 3 ή λιγότερες ώρες ( $\Lambda\Sigma K=1.199$ ; 95% ΔΕ: 1.020, 1.410). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τις πρακτικές υγείας που δίνουν έμφαση σε έναν υγιεινό τρόπο ζωής με λιγότερη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Επίσης ενισχύουν πρακτικές ιατρικής ακριβείας με στόχο την πρόληψη τους μελανώματος, ιδιαίτερα σε άτομα τα οποία φέρουν επιβραβυμένο γενετικό φορτίο. Στόχος των ευρημάτων αυτών είναι η τροποποίηση του τρόπου ζωής στα άτομα με υψηλό γενετικό κίνδυνο, με την προσδοκία ότι η γνώση του γενετικού κινδύνου τους μπορεί να παρακινήσει τη μεταβολή της συμπεριφοράς τους ως προς την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.

Η μελέτη αυτή είχε αρκετά πλεονεκτήματα που περιλαμβάνουν τον ορισμό των περιπτώσεων μελανώματος μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS), τα έως 9 έτη παρακαλούθησης των συμμετεχόντων, την υψηλής ποιότητας πληροφόρηση για τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων καθώς και τη χρήση ενός γενετικού δείκτη κινδύνου από όλους τους 20 γενετικούς πολυμορφισμούς που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (44). Η μελέτη μας αυτή είχε και αρκετούς περιορισμούς. Πρώτον, η μέτρηση του χρόνου που δαπανήθηκε σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού εκτιμήθηκε με ένα ερωτηματολόγιο με οθόνη αφής, το οποίο δεν διέθετε πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο δαπανήθηκαν αυτές οι ώρες, όπως για παράδειγμα αν ήταν επαγγελματικός χρόνος ή χρόνος διακοπών/διασκέδασης. Δεύτερον, η έλλειψη στην ακρίβεια ορισμού άλλων μεταβλητών που σχετίζονται με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, όπως η χρήση αντιηλιακής προστασίας, δεν μας επέτρεψε να τις

συμπεριλάβουμε σε έναν πιο ισχυρο δείκτη αξιολόγησης της ηλιακής έκθεσης, ο οποίος θα περιελάμβανε περισσότερους παράγοντες.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας αυτή έδειξε πως η συμμόρφωση σε έναν υγιεινό τρόπο ζωής, με λιγότερες ώρες σε εξωτερικούς χώρους κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, σχετίζεται με ένα σημαντικά μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, ιδιαίτερα σε άτομα με υψηλή γενετική προδιάθεση. Επικύρωση των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερους πληθυσμούς καθώς και άτομα από τη Νότια Ευρώπη κρίνεται αναγκαία.

## 2.4 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ: ΜΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΝΤΕΛΙΑΝΗΣ ΤΥΧΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ

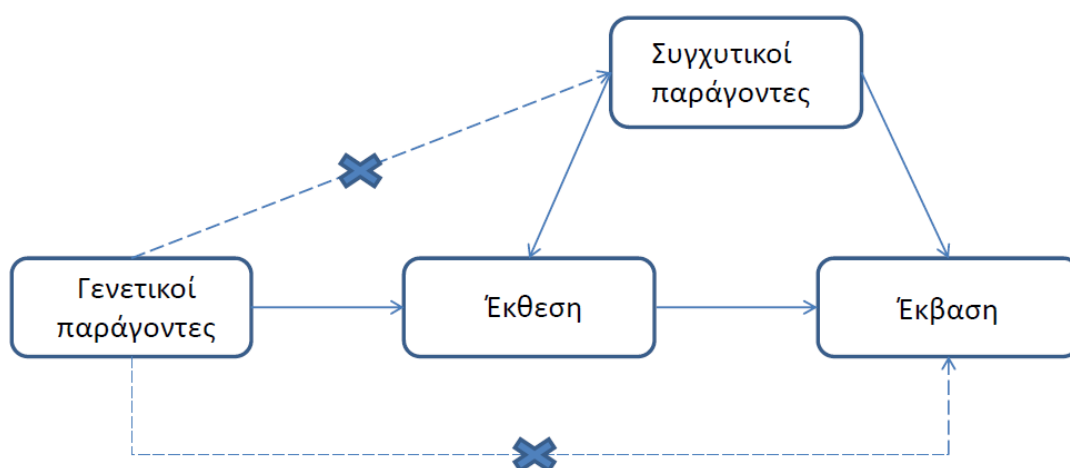
### 2.4.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Εκτός από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου (φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, οικογενειακό ιστορικό, έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και γενετικοί παράγοντες), μελέτες προσπάθησαν να διερευνήσουν κατά πόσο παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή μπορεί να ευθύνονται για την ανάπτυξη του μελανώματος. Το Πρόγραμμα Συνεχιζόμενης Ενημέρωσης (CUP) του Παγκόσμιου Οργανισμού Χρηματοδότησης της Έρευνας για τον Καρκίνο (WCRF) ανέφερε την ύπαρξη ενδείξεων συσχέτισης μεταξύ διατροφικών παραγόντων και του κινδύνου μελανώματος (136). Τα αποτελέσματα της μεγάλης αυτής πηγής επιστημονικής έρευνας στον τομέα της πρόληψης του καρκίνου μέσω διατροφής, δίαιτας και σωματικής άσκησης υπέδειξαν πως η κατανάλωση καφέ μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο μελανώματος στις γυναίκες (<https://www.wcrf.org/dietandcancer/skin-cancer>). Τα αποτελέσματα του CUP υπέδειξαν επίσης πως η βιταμίνη D λειτουργεί προστατευτικά ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος (136) και η προηγούμενη έκδοση του συγκεκριμένου προγράμματος (137) κατέληξε σε περιορισμένες ενδείξεις σχετικά με τη λήψη β-καροτίνης και τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.

Πρόσφατη σύνοψη συστηματικών ανασκοπήσεων (umbrella review) (134) αποσκοπούσε στη χαρτογράφηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τους μη γενετικούς παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τους καρκίνους του δέρματος. Η μελέτη αυτή παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική, αλλά μικρής ισχύος, συσχέτιση μεταξύ κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος και διατροφικών παραγόντων όπως η ρετινόλη (138) και η κατανάλωση καφέ (139). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η σχέση βιταμίνης D και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος είναι αρκετά αμφιλεγόμενη (140). Η διερεύνηση της συσχέτισης των διατροφικών παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος χρησιμοποιώντας μελέτες παρατήρησης επηρεάζεται από τα σχετικά μικρά μεγέθη δείγματος των συγκεκριμένων μελετών, τα οποία κυμαίνονται από 2,200 έως 7,100 περιστατικά μελανώματος σε μελέτες μετά-αναλύσεων για τη λήψη βιταμίνης D και ρετινόλης, την κατανάλωση καφέ, καθώς και από διάφορα μεθοδολογικά σφάλματα. Παραμένει ωστόσο αβέβαιο κατά πόσο οι χαμηλής ισχύος αυτές συσχετίσεις είναι αιτιακές,

δεδομένου ότι οι μελέτες παρατήρησης είναι δύσκολο να προστατευθούν από σφάλματα που σχετίζονται με αντίστροφη αιτιώδης συσχέτιση ή συγχυτικά σφάλματα. Η Μεντελιανή τυχαιοποίηση (MR) (141) προσφέρει έναν τρόπο να διερευνηθούν πιθανές αιτιώδεις σχέσεις με τη χρήση γενετικών συσχετίσεων για να αξιολογηθεί η επίδραση της έκθεσης (παράγοντας κινδύνου) στην έκβαση (χαρακτηριστικό/ ασθένεια/ νόσημα). Δεδομένου ότι τα γονίδια ταξινομούνται τυχαία κατά το σχηματισμό των γαμετών και τη σύλληψη, τα σφάλματα που προυπάρχουν σε μελέτες παρατήρησης, όπως η σύγχυση, είναι αρκετά πιθανό να ελαχιστοποιούνται σε MR μελέτες (Εικόνα 15).

Η MR ανάλυση έχει τρεις βασικές υποθέσεις, οι οποίες αν παραβιαστούν, θα οδηγήσουν σε σφάλμα. Πρώτον, οι γενετικοί παράγοντες πρέπει να σχετίζονται ισχυρά με την έκθεση. Δεύτερον, οι γενετικοί παράγοντες πρέπει να επηρεάζουν την έκβαση μόνο μέσω της επίδρασής τους στην έκθεση και η τρίτη υπόθεση είναι πως οι γενετικοί δείκτες δεν πρέπει να σχετίζονται με συγχυτικούς παράγοντες μεταξύ της έκθεσης και της έκβασης.



**Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση MR ανάλυσης**

Πραγματοποιήσαμε μια MR μελέτη για να εξεταστεί η πιθανή αιτιώδης σχέση μεταξύ διατροφικών παραγόντων και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρωτικά στοιχεία από τις μεγαλύτερες GWAS που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα την κατανάλωση καφέ (142), την λήψη β-καροτένης (143) και ρετινόλης (144), καθώς και τη συγκέντρωση βιταμίνης D (145), οι οποίοι αποτέλεσαν τους παράγοντες έκθεσης. Τα δεδομένα για το μελάνωμα (έκβαση) συγκεντρώθηκαν από τη βιοτράπεζα της UK Biobank (75).

## 2.4.2 Μεθοδολογία

### Δεδομένα γενετικής επιδημιολογίας για την έκθεση

Οι πολυμορφισμοί που χρησιμοποιήθηκαν σαν επεξηγηματικές μεταβλητές (IVs) της MR ανάλυσης για τους διατροφικούς παράγοντες ανακτήθηκαν από τη μεγαλύτερη GWAS που έχει δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για κάθε έναν παράγοντα. Για τους σκοπούς της MR ανάλυσης η επιλογή των πολυμορφισμών περιορίστηκε σε όσους έχουν συσχετιστεί με τους υπό εξέταση διατροφικούς παράγοντες σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) στις GWAS. Εντοπίσαμε 10 πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με την κατανάλωση καφέ σε μια GWAS ~130,000 συμμετεχόντων (142). Εντοπίσαμε επίσης έναν πολυμορφισμό που συσχετίστηκε σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με την πρόσληψη β-καροτένης σε μια GWAS 3,881 συμμετεχόντων ευρωπαϊκής καταγωγής (143) και 2 πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με την πρόσληψη ρετινόλης σε μια GWAS 5,006 συμμετεχόντων καυκάσιας καταγωγής που προήλθαν από δύο κόορτες (144). Για τη βιταμίνη D, 6 πολυμορφισμοί συσχετίστηκαν ισχυρά σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με τα επίπεδα βιταμίνης D στον ορό σε μια GWAS 79,366 ευρωπαίων συμμετεχόντων (145).

### Δεδομένα γενετικής επιδημιολογίας για την έκβαση

Οι επιδράσεις του συνολικού αριθμού των επεξηγηματικών μεταβλητών (IVs) στον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος εκτιμήθηκαν στη βιοτράπεζα της UK Biobank (75). Για την παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα υποσύνολο του πληθυσμού της βιοτράπεζας UK Biobank, οι οποίοι ήταν μη συγγενικά άτομα, είχαν διαθέσιμα γενετικά δεδομένα και ήταν ευρωπαϊκής προέλευσης. Πιο αναλυτικά, αποκλείστηκαν άτομα χωρίς διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, άτομα με μη ευρωπαϊκή καταγωγή και με τη χρήση των κεντρικά παρεχόμενων δεδομένων συγγενείας της UK Biobank, αποκλείσαμε από την ανάλυση οποιαδήποτε ζεύγη συγγενών 1ου και 2ου βαθμού.

Δεδομένα για την εμφάνιση του καρκίνου ήταν διαθέσιμα για κάθε συμμετέχοντα μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Εντοπίστηκαν 2,862 μη συγγενικά άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής με



διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, των οποίων η πρωτογενής διάγνωση καρκίνου ήταν μελάνωμα σύμφωνα με τους κώδικούς ICD-9 (172) και ICD-10 (C43).). Από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες της UK Biobank επιλέχθηκαν 321,568 υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο οι οποίοι δεν είχαν ποτέ διαγνωσθεί με καρκίνο ή είχαν αναφέρει την ύπαρξη καρκίνου μέσω αυτοαναφοράς και δεν είχαν καταχωρηθεί ποτέ στο εθνικό μητρώο καρκίνου. Ως εκ τούτου, στην ανάλυση μας συμπεριλήφθηκαν 324,440 συμμετέχοντες.

## Εγκυρότητα πολυμορφισμών

### Ανισορροπία Σύνδεσης (LD)

Μία από τις βασικές υποθέσεις της MR ανάλυσης είναι πως οι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την έκθεση δεν πρέπει να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (LD) μεταξύ τους, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση. Ένας πολυμορφισμός δεν πρέπει να συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με έναν άλλο όταν και οι δύο χρησιμοποιούνται σαν επεξηγηματικές μεταβλητές στην MR ανάλυση (90). Για να διασφαλιστεί αυτό υπολογίστηκε η ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ των επιλεγμένων πολυμορφισμών για κάθε διατροφικό παράγοντα χρησιμοποιώντας το LDlink 3.0 (146, 147). Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν μη-ανεξάρτητοι πολυμορφισμοί, ( $r^2 > 0.2$ ) και παρέμεινε στην ανάλυση ο πολυμορφισμός αυτός που συσχετιζόταν πιο ισχυρά με τον κάθε διατροφικό παράγοντα βάση της τιμής  $P$ , όταν δύο ή περισσότεροι πολυμορφισμοί ήταν σε υψηλή ανισορροπία σύνδεσης (LD).

### Πλειοτροπία

Ακόμα μία υπόθεση της MR ανάλυσης είναι η απουσία πλειοτροπίας, το οποίο σημαίνει πως κάθε πολυμορφισμός θα πρέπει να επηρεάζει την έκβαση μόνο μέσω της έκθεσης και όχι από κάποιο άλλο ανεξάρτητο βιολογικό μονοπάτι ( $2^{\text{η}}$  υπόθεση). Αν παραβιαστεί η υπόθεση αυτή, η MR ανάλυση μπορεί να καταλήξει σε εσφαλμένα συμπεράσματα (148). Η MR-Egger μέθοδος είναι αυτή που εξετάζει την ύπαρξη πλειοτροπίας. Οι εκτιμητές επίδρασης των πολυμορφισμών στην έκθεση αναπαριστώνται διαγραμματικά έναντι των εκτιμητών επίδρασης των ίδιων πολυμορφισμών στην έκβαση και αν απουσιάζει η πλειοτροπία, τότε τα σημεία τομής των εκτιμητών εφάπτονται κατά μήκος μιας γραμμής που διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Τιμές των όρων της σταθεράς που παρεκκλίνουν από το 0 υποδεικνύουν την ύπαρξη πλειοτροπίας. Η κλίση της MR-Egger

παλινδρόμησης δίνει αιτιώδεις εκτιμητές διορθωμένους ως προς την πλειοτροπία. Η προσέγγιση αυτή προϋποθέτει πως οι οριζόντιες πλειοτροπικές επιδράσεις δεν συσχετίζονται με τις επιδράσεις των πολυμορφισμών στην έκθεση (υπόθεση InSIDE) (149). Χρησιμοποιήσαμε επίσης την προσέγγιση Σταθμισμένης Διαμέσου (Weighted Median) για να εξετάσουμε την ύπαρξη πλειοτροπίας (150). Η προσέγγιση αυτή διατάσσει τις MR εκτιμήσεις που δημιουργούνται από κάθε επεξηγηματική μεταβλητή (IV) χωριστά βάση της αντίστροφης τιμής των διακυμάνσεών τους και καταγράφει τη διάμεση τιμή (151). Η διαδικασία αυτή υποθέτει πως μόνο οι μισοί πολυμορφισμοί χρειάζεται να είναι έγκυρες επεξηγηματικές μεταβλητές (δηλ. να μη παρουσιάζουν πλειοτροπία, να μη σχετίζονται με συγχυτές και να έχουν ισχυρή συσχέτιση με την έκθεση). Η μέθοδος αυτή βελτιώνει την ακρίβεια σε σύγκριση με τη μέθοδο της MR-Egger παλινδρόμησης (150).

### **Έλεγχος συσχέτισης επιλεγμένων πολυμορφισμών με συγχυτικούς παράγοντες**

Η τρίτη υπόθεση της MR ανάλυσης αναφέρει πως οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σαν επεξηγηματικές μεταβλητές (IVs) δεν πρέπει σχετίζονται με συγχυτικούς παράγοντες μεταξύ της έκθεσης και της έκβασης. Για να ελεγχθεί η υπόθεση αυτή αναζητήσαμε συσχετίσεις των υποψήφιων πολυμορφισμών με άλλες ασθένειες και χαρακτηριστικά στη βάση δεδομένων Phenoscanner που περιέχει αποτελέσματα από μεγάλες GWAS για ένα σύνολο πάνω από 10 εκατομμύρια πολυμορφισμούς (118). Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε μια MR ανάλυση ευαισθησίας, αφαιρώντας τους πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν με πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες.

### **Στατιστική ανάλυση**

Πραγματοποιήσαμε μια MR ανάλυση δύο δειγμάτων (two sample MR analyses) για να εξεταστούν πιθανές αιτιώδεις συσχετίσεις μεταξύ διατροφικών παραγόντων όπως καφές, β-καροτένη, ρετινόλη και βιταμίνη D με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Οι πολυμορφισμοί που συσχετίστηκαν ισχυρά σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας από τις μεγαλύτερες GWAS για κάθε έναν από τους διατροφικούς παράγοντες, εξετάστηκαν για τη συσχέτισή τους με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στην βιοτράπεζα UK Biobank. Για τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στην UK Biobank χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό γενετικών αναλύσεων Plink 1.9 (152).

Ο συνηθέστερος και απλούστερος τρόπος για να ληφθεί ένας MR εκτιμητής είναι η μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) (153). Η μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι κανένας από τους πολυμορφισμούς δεν παρουσιάζει οριζόντια πλειοτροπία ή παραβιάζει τις άλλες υποθέσεις. Η μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) τυχαίων επιδράσεων είναι πιο ελαστική στην υπόθεση της απουσίας πλειοτροπίας (154), και η διακύμανση αυτού του μοντέλου λαμβάνει υπόψη της την ετερογένεια μεταξύ των πολυμορφισμών.

Εναλλακτικός τρόπος για να ληφθούν MR εκτιμητές είναι χρησιμοποιώντας την μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood), με την οποία η αιτιώδης επίδραση εκτιμάται από την μεγιστοποίηση της πιθανοφάνειας, λαμβάνοντας υπόψιν τις επιδράσεις των πολυμορφισμών με την έκθεση και με την έκβαση και υποθέτοντας μια γραμμική σχέση μεταξύ έκθεσης και έκβασης (155). Όμοια με την μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) σταθερών επιδράσεων, η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας υποθέτει πως δεν υπάρχει ετερογένεια και πλειοτροπία. Όλες οι MR αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο στατιστικό πακέτο R v3.5.1 (R Core Team)

### 2.4.3. Αποτελέσματα

#### Επιλογή πολυμορφισμών

Εντοπίσαμε συνολικά 19 πολυμορφισμούς που συσχετίστηκαν ισχυρά σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας με την κατανάλωση καφέ (10 πολυμορφισμοί), την πρόσληψη β-καροτένης (1 πολυμορφισμός), την λήψη ρετινόλης (2 πολυμορφισμοί) και τη συγκέντρωση βιταμίνης D στον οργανισμό (6 πολυμορφισμοί). Στη συνέχεια εξετάστηκε αν οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης (LD), βάση του ορίου που τέθηκε ( $r^2 > 0.2$ ) ανά διατροφικό παράγοντα. Σε κάθε ομάδα πολυμορφισμών που ήταν σε ανισορροπία σύνδεσης ανά διατροφικό παράγοντα επιλέξαμε αυτόν με την πιο ισχυρή συσχέτιση. Σαν αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας καταλήξαμε σε 8 πολυμορφισμούς για κατανάλωση καφέ, έναν για πρόσληψη β-καροτένης, 2 για λήψη ρετινόλης και 6 για επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό.

Στον Πίνακα 19 καταγράφονται οι εκτιμητές των συσχετίσεων μεταξύ κάθε πολυμορφισμού με τον αντίστοιχο διατροφικό παράγοντα και τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.

Πίνακας 19. Συσχετίσεις των πολυμορφισμών που επιλέχθηκαν για την MR ανάλυση με τους διατροφικούς παράγοντες και τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος

Διατροφικός παράγοντας	Πολυμορφισμός	Χρωμ	Θέση	A1	A2	Αποτελέσματα για τους διατροφικούς παράγοντες				Αποτελέσματα για το μελάνωμα			
						Συχνότητα A1	β	τ.σ	P τιμή	Συχνότητα A1	β	τ.σ	P τιμή
Καφές	rs1260326	2	27730940	T	C	0.41	-0.04	0.01	$7.14 \times 10^{-8}$	0.388	-0.047	0.045	0.2914
Καφές	rs1481012	4	89039082	A	G	0.89	0.06	0.01	$8.93 \times 10^{-8}$	0.889	-0.014	0.069	0.8283
Καφές	rs4410790	7	17284577	T	C	0.37	-0.1	0.01	$3.08 \times 10^{-17}$	0.378	0.020	0.045	0.6455
Καφές	rs7800944	7	73035857	T	C	0.72	-0.05	0.01	$2.29 \times 10^{-11}$	0.718	0.036	0.049	0.4571
Καφές	rs17685	7	75616105	A	G	0.29	0.07	0.01	$4.26 \times 10^{-11}$	0.277	0.014	0.048	0.7655
Καφές	rs6265	11	27679916	T	C	0.19	-0.04	0.01	$2.69 \times 10^{-6}$	0.186	0.004	0.056	0.93
Καφές	rs2472297	15	75027880	T	C	0.24	0.14	0.01	$2.47 \times 10^{-24}$	0.250	-0.020	0.050	0.6845
Καφές	rs9902453	17	28349095	A	G	0.54	-0.03	0.01	$2.44 \times 10^{-8}$	0.555	0.013	0.044	0.7518
Β-καροτένη	rs6564851	16	81264597	T	G	0.39	0.149	0.015	$1.60 \times 10^{-24}$	0.470	0.005	0.044	0.8933
Ρετινόλη	rs10882272	10	95348182	C	T	0.35	-0.03	0.004	$6.51 \times 10^{-15}$	0.384	0.001	0.045	0.9648
Ρετινόλη	rs1667255	18	29187279	C	A	0.31	0.03	0.004	$6.35 \times 10^{-14}$	0.393	-0.011	0.045	0.792
Βιταμίνη D	rs3755967	4	72609398	T	C	0.28	-0.089	0.0023	$4.7 \times 10^{-343}$	0.287	0.045	0.048	0.3345
Βιταμίνη D	rs12785878	11	71167449	T	G	0.75	0.036	0.0022	$3.80 \times 10^{-62}$	0.758	-0.005	0.053	0.9136
Βιταμίνη D	rs10741657	11	14914878	A	G	0.4	0.031	0.0022	$2.05 \times 10^{-46}$	0.397	-0.012	0.044	0.7799
Βιταμίνη D	rs10745742	12	96358529	T	C	0.39	0.019	0.002	$2.10 \times 10^{-20}$	0.383	0.030	0.045	0.5086
Βιταμίνη D	rs8018720	14	39556185	C	G	0.82	-0.019	0.0027	$1.11 \times 10^{-11}$	0.821	0.072	0.058	0.2159

Συντομογραφίες: A1: Αλληλόμορφο Κινδύνου, A2: Αλληλόμορφο αναφοράς, τ.σ: Τυπικό Σφάλμα, Χρωμ: Χρωμόσωμα

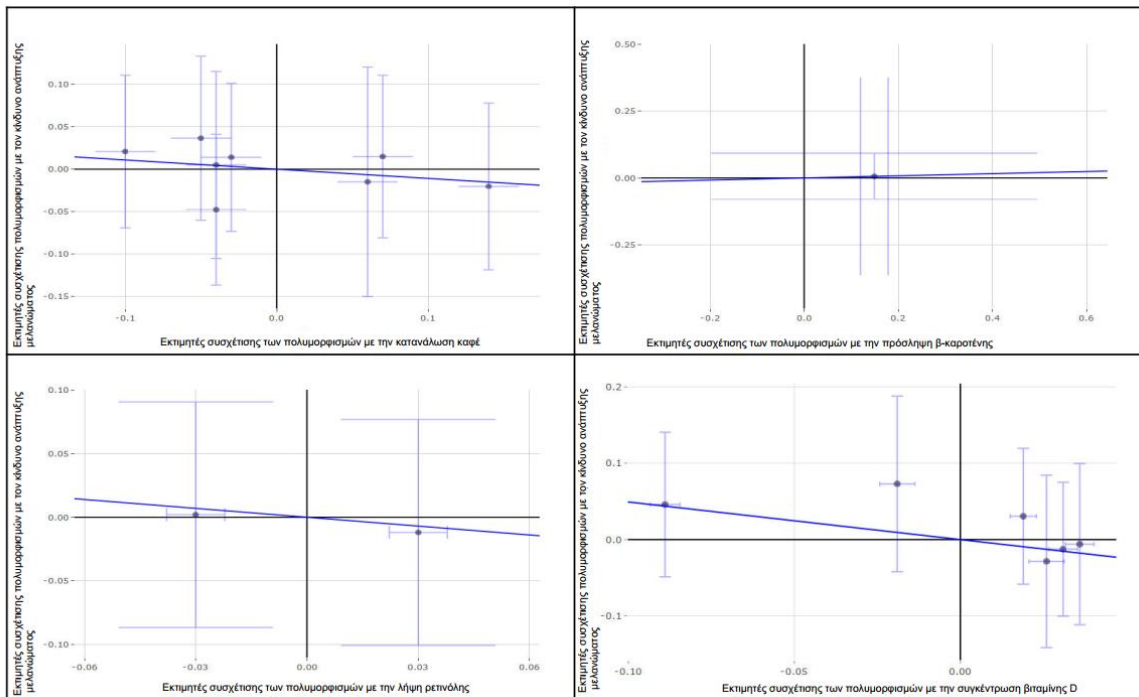
Στον επόμενο Πίνακα (Πίνακας 20) καταγράφονται οι MR εκτιμητές μεταξύ κάθε διατροφικού παράγοντα και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος με τις μεθόδους της μετα-ανάλυσης αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) και της μεθόδου μέγιστης πιθανοφάνειας. Στον Πίνακα 19 αναφέρονται επίσης και οι εκτιμητές της MR-Egger παλινδρόμησης καθώς και της προσέγγισης Σταθμισμένης Διαμέσου, οι οποίοι αξιολογούν πιθανές παραβιάσεις των υποθέσεων της MR ανάλυση.

**Πίνακας 20. Αποτελέσματα MR ανάλυσης**

	N	Μετα-ανάλυσης αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW)				Μέθοδος Μέγιστης Πιθανοφάνειας				MR-Egger Παλινδρόμηση								
		ΛΑ	95% ΔΕ	P τιμή	P τιμή ετερογένειας	ΛΑ	95% ΔΕ	P τιμή	P τιμή ετερογένειας	Σταθερός όρος			Κλίση			Σταθμισμένη Διάμεσος		
Διατροφικός παράγοντας										ΛΑ	95% ΔΕ	P τιμή	ΛΑ	95% ΔΕ	P τιμή	ΛΑ	95% ΔΕ	P τιμή
Καφές	8	0.897	0.566, 1.422	0.644	0.9565	0.897	0.565, 1.422	0.643	0.9566	1.011	0.940, 1.087	0.771	0.790	0.298, 2.092	0.634	0.849	0.489, 1.474	0.562
β-καροτένη	1	1.041	0.582, 1.861	0.892	-	1.041	0.582, 1.861	0.892	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ρετινόλη	2	0.793	0.097, 6.430	0.828	0.8764	0.792	0.097, 6.436	0.828	0.8764	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Βιταμίνη D	6	0.611	0.250, 1.495	0.281	0.8391	0.611	0.249, 1.495	0.280	0.8392	1.001	0.929, 1.079	0.982	0.602	0.115, 3.139	0.539	0.611	0.229, 1.631	0.325

Συνομογραφίες: N: Πλήθος πολυμορφισμών που αξιολογήθηκαν στην MR ανάλυση, ΛΑ=Λόγος Αναλογιών, ΔΕ=Διάστημα Εμπιστοσύνης

Η MR ανάλυση χρησιμοποιώντας είτε την μέθοδο της μετα-ανάλυσης αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) είτε και τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας δεν κατέληξε σε σημαντικά ευρήματα για την αιτιώδη σχέση των υπό εξέταση διατροφικών παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Όλες αυτές οι μη-σημαντικές συσχετίσεις αναπαριστώνται γραφικά στην Εικόνα 16, όπου στον οριζόντιο άξονα απεικονίζονται εκτιμητές συσχέτισης των πολυμορφισμών με τον αντίστοιχο διατροφικό παράγοντα από τον οποίο προήλθαν και στον κάθετο άξονα οι εκτιμητές συσχέτισης των ίδιων πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.



**Εικόνα 16. Διαγράμματα σημείων για τις συσχετίσεις μεταξύ των πολυμορφισμών με κάθε διατροφικό παράγοντα και με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος.**

Στα διαγράμματα αναπαριστώνται οι εκτιμητές συσχέτισης κάθε πολυμορφισμού (εκτιμητές  $\beta$ ) με τον αντίστοιχο διατροφικό παράγοντα έναντι των αντίστοιχων συσχετίσεων κάθε πολυμορφισμού (εκτιμητές  $\beta$ ) με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, μαζί με τα 95% ΔΕ. Η μπλε ευθεία γραμμή αναπαριστά τον MR εκτιμητή από τη μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των MR εκτιμητών είναι έγκυρη μόνο αν ικανοποιούνται οι τρεις βασικές υποθέσεις της MR ανάλυσης. Η πρώτη υπόθεση, πως οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί πρέπει να σχετίζονται ισχυρά με την έκθεση ικανοποιείται, καθώς επιλέχθηκαν πολυμορφισμοί που σχετίζονται με κάθε διατροφικό παράγοντα σε επίπεδο ευρυ-γονιδιωματικής σημαντικότητας.

Η δεύτερη υπόθεση, πως οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί πρέπει να επηρεάζουν την έκθεση μόνο μέσω της επίδρασής τους στην έκθεση ικανοποιείται από τον έλεγχο της πλειοτροπίας της μεθόδου MR-Egger παλινδρόμησης. Ο σταθερός όρος της MR-Egger παλινδρόμησης φανερώνει την ύπαρξη ή όχι πλειοτροπίας. Τα αποτελέσματα απορρίπτουν την ύπαρξη πλειοτροπίας.



Για τον έλεγχο της τρίτης υπόθεσης, πως οι επιλεγμένοι πολυμορφισμοί δεν σχετίζονται με συγγυτικούς παράγοντες μεταξύ της έκθεσης και της έκβασης, αναζητήσαμε συσχετίσεις των επιλεγμένων πολυμορφισμών με άλλες ασθένειες και χαρακτηριστικά στη βάση του Rhenoscaner. Πολυμορφισμοί που συσχετίστηκαν ισχυρά με την κατανάλωση καφέ, βρέθηκαν να συσχετίζονται ισχυρά και με άλλες ασθένειες ή χαρακτηριστικά. Ο πολυμορφισμός rs1260326 έχει συσχετιστεί ισχυρά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον οργανισμό (156), τα επίπεδα μεταβολιτών του αίματος (157), τα επίπεδα ουρίας και τα ποσοστά πρωτεΐνης CRP (158), τα επίπεδα λιπιδίων (159) και επίπεδα γλυκόζης (160). Ο πολυμορφισμός rs1481012 έχει συσχετιστεί ισχυρά με τα επίπεδα ουρίας και την αρθρίτιδα (158) και ο πολυμορφισμός rs6265 με ανθρωπομετρικές μετρήσεις (74) και κάπνισμα (161). Τέλος ο πολυμορφισμός rs7800944 έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων (156) και τα επίπεδα λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) (162). Η MR ανάλυση ευαισθησίας αφαιρώντας αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν κατέληξε σε στατιστικά σημαντικούς εκτιμητές ( $\lambda A=0.881$ ,  $P$  τιμή=0.625,  $P$  τιμή ετερογένειας=0.9557). Πολυμορφισμοί που συσχετίστηκαν ισχυρά με συγκέντρωση βιταμίνης D, βρέθηκαν να συσχετίζονται ισχυρά με τα επίπεδα μεθυλίωσης (rs10745742) (163) και με τα επίπεδα κρεατινίνης (rs17216707) (164). Και σε αυτή τη περίπτωση η MR ανάλυση ευαισθησίας αφαιρώντας αυτούς τους πολυμορφισμούς δεν κατέληξε σε στατιστικά σημαντικούς εκτιμητές ( $\lambda A=0.579$ ,  $P$  τιμή=0.25,  $P$  τιμή ετερογένειας=0.75).

#### 2.4.4 Συζήτηση

Σε αυτή την MR ανάλυση παρατηρήθηκε πως δεν υπάρχει σημαντική αιτιώδης σχέση μεταξύ επιλεγμένων διατροφικών παραγόντων και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τη μετα-ανάλυση αντίστροφης διακύμανσης με βάρη (IVW) αλλά και από τη μέθοδο Μέγιστης Πιθανοφάνειας.

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν ερευνήσει τη συσχέτιση διατροφικών παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, αλλά η πλειοψηφία τους πάσχει από μικρά μεγέθη δείγματος και μεθοδολογικά σφάλματα ενώ άλλες δείχνουν αντιφατικά αποτελέσματα (165). Τα παραπάνω υπογραμμίζουν την ανάγκη ανάπτυξης μελετών με μεγαλύτερα δείγματα και χρήσης εγκυρότερων μέτρων καταγραφής των διατροφικών παραγόντων (πχ. χρήση βιοδεικτών).

Η μελέτη αυτή είχε κάποια πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Το κύριο όφελος από τη χρήση MR μελετών είναι η αποφυγή σφαλμάτων που συναντάμε στη βιβλιογραφία των κλασικών μελετών παρατήρησης όπως τα σφάλματα σύγχυσης, η αντίστροφη αιτιακή σχέση και τα σφάλματα στην μέτρηση της έκθεσης. Επιπλέον, με τη χρήση γενετικών δεικτών στην MR ανάλυση, ερευνάται η δια βίου έκθεση στους διατροφικούς παράγοντες σε αντίθεση με τις μελέτες παρατήρησης και κλινικές δοκιμές όπου υπάρχει χρονικό όριο. Βασικός περιορισμός στην MR ανάλυση που διεξήχθη ήταν πως τα συνοπτικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την ανάλυση δεν επιτρέπουν να στρωματοποιηθεί η ανάλυση βάση παραγόντων που ενδεχομένως να επηρεάσουν τα τελικά αποτελέσματα, όπως η ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα ή το δείκτης μάζας σώματος.

Συνοπτικά δεν εντοπίσαμε στατιστικά σημαντική αιτιώδη σχέση μεταξύ κατανάλωσης καφέ, πρόσληψης β-καροτένης, λήψης ρετινόλης και συγκέντρωσης βιταμίνης D στον οργανισμό με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος με τη χρήση της μεθόδου MR. Σαν επόμενο βήμα της παραπάνω ανάλυσης θα προσπαθήσουμε να αυξήσουμε την ισχύ αυξάνοντας το δείγμα για τον πληθυσμό της έκβασης. Στα περιστατικά μελανώματος και υγιών μαρτύρων της βιοτράπεζας UK Biobank, θα προστέθει ο πληθυσμός του συνασπισμού MelaNostrum, ο οποίος ερευνά την ανάπτυξη του μελανώματος στις μεσογειακές χώρες. Ο συνασπισμός αυτός περιλαμβάνει 3,102 ιστολογικά επιβεβαιωμένα περιστατικά μελανώματος και 2,301 υγιείς μάρτυρες από Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα και Κύπρο.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Από την παρούσα διατριβή προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Πρώτον, αποδείχθηκε πως η προσθήκη κοινών πολυμορφισμών, που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, σε ένα φαινοτυπικό μοντέλο πρόβλεψης βελτιώνει οριακά, αλλά όχι σημαντικά την προγνωστική του ικανότητα. Από το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει πως η χρήση του γενετικού προφίλ ενισχύει, αλλά όχι σημαντικά την εξατομικευμένη πρόβλεψη κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος, τουλάχιστον σε πληθυσμό της νότιας Ευρώπης. Δεύτερον, κανένα από τα υποψήφια γονίδια από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος δεν φαίνεται σχετίζεται σημαντικά με τον κίνδυνο αυτό. Είναι πιθανό τα αποτελέσματα αυτών των μελετών να υπερεκτιμώνται τακτικά και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποφευχθούν μελλοντικές μελέτες υποψηφίων γονιδίων πάνω σε αυτούς τους πολυμορφισμούς σε σχέση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, ώστε να περιοριστεί η σπατάλη χρόνου και πόρων και το ενδιαφέρον θα πρέπει να στραφεί στη δημιουργία μεγαλύτερων GWAS. Τρίτον, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Η επίδραση αυτή είναι ισχυρότερη στα άτομα με επιβαρυσμένο γενετικό υπόβαθρο. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν πρακτικές ιατρικής ακριβείας με στόχο την πρόληψη τους μελανώματος, ιδιαίτερα σε άτομα τα οποία φέρουν επιβεβαρυσμένο γενετικό φορτίο. Τέλος, παρατηρήθηκε πως δεν υπάρχει σημαντική αιτιώδης σχέση μεταξύ επιλεγμένων διατροφικών παραγόντων και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Τα αποτελέσματα όμως αυτά είναι προκαταρκτικά, καθώς στη συγκεκριμένη ανάλυση αναμένεται αύξηση των περιστατικών μελανώματος, με την προσθήκη ενός πληθυσμού νοτιοευρωπαϊκής προέλευσης.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μελάνωμα είναι μια σύνθετη μορφή καρκίνου και η ανάπτυξή του περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, περιβαλλοντικών εκθέσεων και γενετικών παραγόντων. Η εύρεση γενετικών τόπων που σχετίζονται με το μελάνωμα μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του και να επιτρέψει την αξιολόγηση των ασθενών βάση του γενετικού τους προφίλ, ενισχύοντας τις πρακτικές ιατρικής ακριβείας με στόχο την πρόληψη και πρόγνωση του κινδύνου του μελανώματος. Στην παρούσα διατριβή, αρχικά αξιολογήθηκε η επίδραση γνωστών γενετικών παραγόντων που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε έναν ανεξάρτητο ελληνικό πληθυσμό ώστε να επικυρωθεί η σημαντικότητα τους. Επιπλέον αξιολογήθηκε η προγνωστική ικανότητα των γενετικών αυτών παραγόντων ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, δημιουργώντας ένα γενετικό δείκτη κινδύνου. Με τον τρόπο αυτό εξετάστηκε κατά πόσο η γενετική προδιάθεση μπορεί να βελτιώσει την πρόβλεψη του κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος σε σχέση με τους γνωστούς φαινοτυπικούς παράγοντες. 15 από τους γνωστούς αυτούς γενετικούς παράγοντες συσχετίστηκαν σημαντικά (τιμή  $P < 0.05$ ) με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στον ελληνικό πληθυσμό. Ο γενετικός δείκτης κινδύνου συσχετίστηκε ισχυρά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Η προσθήκη του γενετικού δείκτη κινδύνου σε ένα φαινοτυπικό μοντέλο πρόβλεψης βελτίωσε οριακά, όχι όμως σημαντικά την προγνωστική ικανότητα του μοντέλου. Στη συνέχεια της διατριβής έγινε προσπάθεια να ανακαλυφθούν και να ταυτοποιηθούν νέοι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος, αξιολογώντας την ήδη υπάρχουσα πληροφορία από την μεγαλύτερη GWAS που έχει πραγματοποιηθεί έως σήμερα για το μελάνωμα. Ο υποψήφιος πολυμορφισμός στον οποίο κατέληξε η αξιολόγηση της ήδη υπάρχουσας πληροφορίας δεν έδειξε σημαντική σχέση σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος ( $P = 1.95 \times 10^{-5}$ ) παρά τον μεγάλο αριθμό περιστατικών μελανώματος που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ( $N = 16,534$ ). Το αποτέλεσμα αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως θα πρέπει να να αποφευχθούν μελλοντικές μελέτες υποψήφιου γονιδίου πάνω σε αυτούς τους πολυμορφισμούς ως προς τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος και το ενδιαφέρον πρέπει να στραφεί στη δημιουργία μεγαλύτερων GWAS. Στο επόμενο κομμάτι της διατριβής εξετάστηκε κατά πόσο η αλληλεπίδραση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τη γενετική προδιάθεση μεταβάλλει τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος στον πληθυσμό της βιοτράπεζας UK Biobank. Κατασκευάστηκε ένας γενετικός δείκτης κινδύνου με βάση γονίδια που σχετίζονται ισχυρά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος και ο πληθυσμός της μελέτης

χωρίστηκε σε ομάδες υψηλού και χαμηλού γενετικού κινδύνου, με βάση τη διάμεση τιμή αυτού του δείκτη. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως ο γενετικός δείκτης κινδύνου και η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία σχετίζονται ισχυρά με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Επιπλέον στην ομάδα υψηλού γενετικού κινδύνου, κάθε επιπλέον ώρα έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος κατά ~4%. Αντίθετα στην ομάδα χαμηλού γενετικού κινδύνου δεν εντοπίστηκε παρόμοια διαφορά. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν πρακτικές ιατρικής ακριβείας με στόχο την πρόληψη του μελανώματος, ιδιαίτερα σε άτομα τα οποία φέρουν επιβεβαρυμένο γενετικό φορτίο. Τέλος στη διατριβή αυτή διερευνήθηκε η αιτιώδης σχέση μεταξύ επιλεγμένων διατροφικών παραγόντων και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος με τη χρήση της μεθόδου της Μεντελιανής τυχαιοποίησης. Η μέθοδος αυτή ενσωματώνει την υπάρχουσα γενετική πληροφορία για τον έλεγχο της αιτιώδους σχέσης μεταξύ μιας έκθεσης και μιας έκβασης, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα να εξαλειφθούν συγχυτικοί παράγοντες που δεν μπορούν να εντοπιστούν πλήρως από τις κλασικές μελέτες παρατήρησης. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρωτικά στοιχεία από τις μεγαλύτερες GWAS που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για την κατανάλωση καφέ, την λήψη β-καροτένης και ρετινόλης, καθώς και τη συγκέντρωση βιταμίνης D, ενώ τα δεδομένα για την εμφάνιση μελανώματος συγκεντρώθηκαν από τη βιοτράπεζα της UK Biobank. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπάρχει σημαντική αιτιώδης σχέση μεταξύ των επιλεγμένων διατροφικών παραγόντων και κινδύνου ανάπτυξης μελανώματος. Σαν επόμενο βήμα αυτής της ανάλυσης, θα προστεθούν νέα δεδομένα για τα περιστατικά μελανώματος από τον συνασπισμό MelaNostrum, ο οποίος ερευνά την ανάπτυξη του μελανώματος στις μεσογειακές χώρες, ώστε να αυξηθεί ο πληθυσμός της έκβασης και κατά συνέπεια η ισχύς της ανάλυσης.

**ABSTRACT**

Author: Georgios Ntritsos

Title: Association between genetic polymorphisms and risk of melanoma

The development of melanoma is a complex process involving the interplay of environmental, phenotypic and genetic risk factors. Novel findings of predisposing genetic variants for melanoma risk may result to deeper understanding of its pathophysiology and to evaluating melanoma cases based on their genetic profile, toward more precise disease risk prediction. In the current thesis, we first attempt to validate an extensive set of SNPs previously associated with melanoma risk in an independent sample of melanoma patients and healthy controls from Greece. In addition, we assessed the cumulative impact of the genetic variants on melanoma risk prediction by calculating a weighted genetic risk score (GRS) and combined this GRS with phenotypic risk factors. This will examine whether the inclusion of common genetic variants in a melanoma prediction model would led to an improvement of its predictive ability compared to a risk prediction model based on phenotypic factors only. Fifteen independent SNPs were significantly associated with melanoma ( $P < 0.05$ ). GRS was strongly associated with melanoma risk, but achieves a modest improvement in risk prediction when added to a phenotypic risk model. We next tried to establish novel susceptibility genetic variants for melanoma by assessing candidate genes in the largest GWAS for melanoma up to date. For our selected genetic variant, no genome-wide significant estimates were obtained ( $P = 1.95 \times 10^{-5}$ ) despite the large number of melanoma cases used in the analysis ( $N = 16,534$ ). Future candidate studies on these variants should be avoided and interest should be shifted to larger GWAS. Next, we examined the role of sun exposure in individuals with higher risk of melanoma incidence based on genetic predisposition within UK Biobank. A weighted GRS was calculated based on previously reported genetic variants that achieved genome-wide significance in their association with melanoma and we divided the population sample in groups of high and low genetic risk based on the median GRS value. GRS and sun exposure were strongly associated with the risk of melanoma. Among participants at high genetic risk, every additional hour of sun exposure increases the risk of melanoma incidence by 4%. We didn't observe similar results among participants at low genetic risk. Those results reinforce precision medical practices with the aim of preventing melanoma, especially in individuals at higher genetic risk. Finally, in the current thesis, we performed Mendelian Randomization to test the possible causal relationship between genetically predicted dietary factors and melanoma. Mendelian

Randomization offers a way to investigate potentially causal relationships by using genetic associations for exploring the effect of modifiable exposure on outcome, and thereby enabling the elimination of bias inherent to observational study designs. We used summary statistics from the largest GWASs up to date for coffee consumption, beta-carotene intake, retinol intake, and serum vitamin D and from UK Biobank for melanoma. The results showed that there is no significant causal relationship between the selected dietary factors and risk of melanoma. As a next step in this analysis, new data on melanoma cases will be added by the MelaNostrum consortium, which investigates the risk of melanoma in the Mediterranean countries, in order to increase the population of the outcome and therefore the strength of the analysis.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(15):2375-90.
2. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, et al. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2010;63(9):1401-19.
3. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*. 2013;132(2):385-400.
4. Guy GP, Jr., Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2015;64(21):591-6.
5. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(6):1161-71.
6. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *The British journal of dermatology*. 2014;170(1):11-9.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(2):394-424.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(1):7-30.
9. Balzi D, Carli P, Geddes M. Malignant melanoma in Europe: changes in mortality rates (1970-90) in European Community countries. *Cancer Causes & Control*. 1997;8(1):85-92.
10. Stang A, Stang K, Stegmaier C, Hakulinen T, Jöckel K-h. Skin melanoma in Saarland: incidence, survival and mortality 1970-1996. *European Journal of Cancer Prevention*. 2001;10(5):407-15.
11. Crocetti E, Carli P. Changes from mid-1980s to late 1990s among clinical and demographic correlates of melanoma thickness. *European journal of dermatology : EJD*. 2003;13(1):72-5.
12. Garbe C, McLeod GRC, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000;89(6):1269-78.
13. Van Der Spek-Keijser LMT, Van Der Rhee HJ, TÓTh G, Van Westering R, Bruijn JA, Coebergh JWW. Site, histological type, and thickness of primary cutaneous malignant melanoma in western Netherlands since 1980. *British Journal of Dermatology*. 1997;136(4):565-71.
14. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(1):23-34.
15. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, et al. Melanoma. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15003.
16. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in dermatology*. 2009;27(1):3-9.
17. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU): Codon Publications

The Authors.; 2017.

18. Hausauer AK, Swetter SM, Cockburn MG, Clarke CA. Increases in melanoma among adolescent girls and young women in California: Trends by socioeconomic status and UV radiation exposure. *Archives of Dermatology*. 2011;147(7):783-9.
19. Czarnecki D. The incidence of melanoma is increasing in the susceptible young Australian population. *Acta dermato-venereologica*. 2014;94(5):539-41.
20. Iannacone MR, Youlden DR, Baade PD, Aitken JF, Green AC. Melanoma incidence trends and survival in adolescents and young adults in Queensland, Australia. *International Journal of Cancer*. 2015;136(3):603-9.
21. Burnet NG, Jefferies SJ, Benson RJ, Hunt DP, Treasure FP. Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden — and should be considered when allocating research funds. *British Journal Of Cancer*. 2005;92:241.
22. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Lejeune F, Kleeberg UR, et al. Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(18):2240-7.
23. Joosse A, Collette S, Suci S, Nijsten T, Patel PM, Keilholz U, et al. Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma: a pooled analysis of five European organisation for research and treatment of cancer randomized controlled trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(18):2337-46.
24. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *British Journal Of Cancer*. 1996;73:1605.
25. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *International Journal of Cancer*. 2005;116(1):144-9.
26. Gandini S, Montella M, Ayala F, Benedetto L, Rossi CR, Vecchiato A, et al. Sun exposure and melanoma prognostic factors. *Oncology letters*. 2016;11(4):2706-14.
27. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16:345.
28. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(11):806-12.
29. Veierod MB, Adami HO, Lund E, Armstrong BK, Weiderpass E. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(1):111-20.
30. Newton-Bishop JA, Chang YM, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, et al. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2011;47(5):732-41.
31. Antonopoulou K, Stefanaki I, Lill CM, Chatzinasiou F, Kypreou KP, Karagianni F, et al. Updated field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in cutaneous melanoma: the MelGene database. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(4):1074-9.
32. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.

33. Autier P, Dore JF, Gefeller O, Cesarini JP, Lejeune F, Koelmel KF, et al. Melanoma risk and residence in sunny areas. EORTC Melanoma Co-operative Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Br J Cancer*. 1997;76(11):1521-4.
34. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2005;41(1):28-44.
35. Chang YM, Barrett JH, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International journal of epidemiology*. 2009;38(3):814-30.
36. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(19):3172-7.
37. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2012;345:e4757.
38. Gandini S, Stanganelli I, Magi S, Mazzoni L, Medri M, Agnoletti V, et al. Melanoma attributable to sunbed use and tan seeking behaviours: an Italian survey. *European journal of dermatology : EJD*. 2014;24(1):35-40.
39. Zhang M, Qureshi AA, Geller AC, Frazier L, Hunter DJ, Han J. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1588-93.
40. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2005;41(14):2040-59.
41. Mucci LA, Hjelmberg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *Jama*. 2016;315(1):68-76.
42. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Familial melanoma: a meta-analysis and estimates of attributable fraction. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(1):65-73.
43. Evangelou E, Stratigos AJ. Lessons from genome-wide studies of melanoma: towards precision medicine. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2016;1(5):443-9.
44. Law MH, Bishop DT, Lee JE, Brossard M, Martin NG, Moses EK, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nature genetics*. 2015;47(9):987-95.
45. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, et al. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2013;11 Suppl 6:1-116, 1-26.
46. Livingstone E, Windemuth-Kieselbach C, Eigentler TK, Rompel R, Trefzer U, Nashan D, et al. A first prospective population-based analysis investigating the actual practice of melanoma diagnosis, treatment and follow-up. *European Journal of Cancer*. 47(13):1977-89.
47. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet*. 2005;366(9489):941-51.
48. Ellsworth DL, Manolio TA. The emerging importance of genetics in epidemiologic research. I. Basic concepts in human genetics and laboratory technology. *Annals of epidemiology*. 1999;9(1):1-16.
49. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*. 2003;33 Suppl:228-37.

50. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *The Lancet*. 2005;366(9490):1036-44.
51. Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. Human disease genes. *Nature*. 2001;409:853.
52. Altmuller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *American journal of human genetics*. 2001;69(5):936-50.
53. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *The Lancet*. 2005;366(9491):1121-31.
54. Lewis CM. Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Briefings in Bioinformatics*. 2002;3(2):146-53.
55. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;573(1):54-69.
56. Risch N, Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. *Science*. 1996;273:1516-7.
57. Teare MD. Candidate gene association studies. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;713:105-17.
58. Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5:589.
59. Manolio TA. Bringing genome-wide association findings into clinical use. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(8):549-58.
60. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-53.
61. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D896-d901.
62. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *The American Journal of Human Genetics*. 2017;101(1):5-22.
63. Panagiotou OA, Willer CJ, Hirschhorn JN, Ioannidis JP. The power of meta-analysis in genome-wide association studies. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:441-65.
64. Evangelou E, Ioannidis JP. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(6):379-89.
65. Georgiopoulos G, Evangelou E. Power considerations for lambda inflation factor in meta-analyses of genome-wide association studies. *Genetics research*. 2016;98:e9.
66. Ioannidis JP, Patsopoulos NA, Evangelou E. Heterogeneity in meta-analyses of genome-wide association investigations. *PLoS one*. 2007;2(9):e841.
67. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, Mifsud B, Pazoki R, Gao H, et al. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits. *Nature genetics*. 2018.
68. Klein RJ. Power analysis for genome-wide association studies. *BMC genetics*. 2007;8:58.
69. Park JH, Wacholder S, Gail MH, Peters U, Jacobs KB, Chanock SJ, et al. Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. *Nature genetics*. 2010;42(7):570-5.
70. Spencer CCA, Su Z, Donnelly P, Marchini J. Designing Genome-Wide Association Studies: Sample Size, Power, Imputation, and the Choice of Genotyping Chip. *PLoS genetics*. 2009;5(5):e1000477.
71. Wu Z, Zhao H. Statistical power of model selection strategies for genome-wide association studies. *PLoS genetics*. 2009;5(7):e1000582.

72. Zondervan KT, Cardon LR. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nature protocols*. 2007;2(10):2492-501.
73. Hong EP, Park JW. Sample Size and Statistical Power Calculation in Genetic Association Studies. *Genomics & Informatics*. 2012;10(2):117-22.
74. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature*. 2015;518(7538):197-206.
75. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. *PLoS medicine*. 2015;12(3):e1001779.
76. Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011;478(7367):103-9.
77. Wain LV, Vaez A, Jansen R, Joehanes R, van der Most PJ, Erzurumluoglu AM, et al. Novel Blood Pressure Locus and Gene Discovery Using Genome-Wide Association Study and Expression Data Sets From Blood and the Kidney. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2017.
78. Gaziano JM, Concato J, Brophy M, Fiore L, Pyarajan S, Breeling J, et al. Million Veteran Program: A mega-biobank to study genetic influences on health and disease. *Journal of clinical epidemiology*. 2016;70:214-23.
79. Leitsalu L, Haller T, Esko T, Tammesoo ML, Alavere H, Snieder H, et al. Cohort Profile: Estonian Biobank of the Estonian Genome Center, University of Tartu. *International journal of epidemiology*. 2015;44(4):1137-47.
80. Hoffmann TJ, Ehret GB, Nandakumar P, Ranatunga D, Schaefer C, Kwok PY, et al. Genome-wide association analyses using electronic health records identify new loci influencing blood pressure variation. *Nature genetics*. 2017;49(1):54-64.
81. Pers TH, Karjalainen JM, Chan Y, Westra HJ, Wood AR, Yang J, et al. Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions. *Nature communications*. 2015;6:5890.
82. Spain SL, Barrett JC. Strategies for fine-mapping complex traits. *Human molecular genetics*. 2015;24(R1):R111-9.
83. Amos CI, Wang LE, Lee JE, Gershenwald JE, Chen WV, Fang S, et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Human molecular genetics*. 2011;20(24):5012-23.
84. Barrett JH, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Aitken JF, Andresen PA, et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. *Nature genetics*. 2011;43(11):1108-13.
85. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nature genetics*. 2009;41(8):920-5.
86. Brown KM, Macgregor S, Montgomery GW, Craig DW, Zhao ZZ, Iyadurai K, et al. Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nature genetics*. 2008;40(7):838-40.
87. Iles MM, Law MH, Stacey SN, Han J, Fang S, Pfeiffer R, et al. A variant in FTO shows association with melanoma risk not due to BMI. *Nature genetics*. 2013;45(4):428-32, 32e1.
88. Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, Zhao ZZ, Henders AK, Stark M, et al. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. *Nature genetics*. 2011;43(11):1114-8.
89. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2013;49(6):1374-403.

90. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Statistics in medicine*. 2008;27(8):1133-63.
91. Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(5):1055-67.
92. Athanasiadis EI, Antonopoulou K, Chatzinasiou F, Lill CM, Bourdakou MM, Sakellariou A, et al. A Web-based database of genetic association studies in cutaneous melanoma enhanced with network-driven data exploration tools. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2014;2014.
93. Chatzinasiou F, Lill CM, Kypreou K, Stefanaki I, Nicolaou V, Spyrou G, et al. Comprehensive field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in cutaneous melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(16):1227-35.
94. Ioannidis JP, Boffetta P, Little J, O'Brien TR, Uitterlinden AG, Vineis P, et al. Assessment of cumulative evidence on genetic associations: interim guidelines. *International journal of epidemiology*. 2008;37(1):120-32.
95. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current protocols in human genetics*. 2009;Chapter 2:Unit 2.12.
96. Arnold M, Raffler J, Pfeufer A, Suhre K, Kastenmuller G. SNIIPA: an interactive, genetic variant-centered annotation browser. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(8):1334-6.
97. Teerlink C, Farnham J, Allen-Brady K, Camp NJ, Thomas A, Leachman S, et al. A unique genome-wide association analysis in extended Utah high-risk pedigrees identifies a novel melanoma risk variant on chromosome arm 10q. *Human genetics*. 2012;131(1):77-85.
98. Davies JR, Chang YM, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, et al. Development and validation of a melanoma risk score based on pooled data from 16 case-control studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015;24(5):817-24.
99. Olsen CM, Neale RE, Green AC, Webb PM, The QS, The Epigene S, et al. Independent validation of six melanoma risk prediction models. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(5):1377-84.
100. Vuong K, McGeechan K, Armstrong BK, Cust AE. Risk prediction models for incident primary cutaneous melanoma: a systematic review. *JAMA dermatology*. 2014;150(4):434-44.
101. Lim NK, Lee JY, Lee JY, Park HY, Cho MC. The Role of Genetic Risk Score in Predicting the Risk of Hypertension in the Korean population: Korean Genome and Epidemiology Study. *PloS one*. 2015;10(6):e0131603.
102. Pereira A, Reis RP, Gomes S, Rodrigues R, Oliveira R, Sousa AC, et al. 6C.07: INCREASE THE PREDICTIVE CAPACITY OF CORONARY RISK WITH A GENETIC SCORE. *Journal of hypertension*. 2015;33 Suppl 1:e81.
103. Smith JA, Ware EB, Middha P, Beacher L, Kardina SL. Current Applications of Genetic Risk Scores to Cardiovascular Outcomes and Subclinical Phenotypes. *Current epidemiology reports*. 2015;2(3):180-90.
104. Cust AE, Goumas C, Vuong K, Davies JR, Barrett JH, Holland EA, et al. MC1R genotype as a predictor of early-onset melanoma, compared with self-reported and physician-measured traditional risk factors: an Australian case-control-family study. *BMC cancer*. 2013;13:406.
105. Fang S, Han J, Zhang M, Wang LE, Wei Q, Amos CI, et al. Joint effect of multiple common SNPs predicts melanoma susceptibility. *PloS one*. 2013;8(12):e85642.

106. Penn LA, Qian M, Zhang E, Ng E, Shao Y, Berwick M, et al. Development of a melanoma risk prediction model incorporating MC1R genotype and indoor tanning exposure: impact of mole phenotype on model performance. *PLoS one*. 2014;9(7):e101507.
107. Stefanaki I, Panagiotou OA, Kodela E, Gogas H, Kypreou KP, Chatzinasiou F, et al. Replication and predictive value of SNPs associated with melanoma and pigmentation traits in a Southern European case-control study. *PLoS one*. 2013;8(2):e55712.
108. Whiteman DC, Green AC. A risk prediction tool for melanoma? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(4):761-3.
109. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(5).
110. So HC, Kwan JS, Cherny SS, Sham PC. Risk prediction of complex diseases from family history and known susceptibility loci, with applications for cancer screening. *American journal of human genetics*. 2011;88(5):548-65.
111. Benjamini Y, Liu W. A step-down multiple hypotheses testing procedure that controls the false discovery rate under independence. *Journal of Statistical Planning and Inference*. 1999;82(1):163-70.
112. Wain LV, Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Artigas MS, et al. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015;3(10):769-81.
113. Bycroft C, Freeman C, Petkova D, Band G, Elliott LT, Sharp K, et al. Genome-wide genetic data on ~500,000 UK Biobank participants. *bioRxiv*. 2017.
114. Kypreou KP, Stefanaki I, Antonopoulou K, Karagianni F, Ntritsos G, Zaras A, et al. Prediction of Melanoma Risk in a Southern European Population Based on a Weighted Genetic Risk Score. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(3):690-5.
115. Hadjisavvas A, Loizidou MA, Middleton N, Michael T, Papachristoforou R, Kakouri E, et al. An investigation of breast cancer risk factors in Cyprus: a case control study. *BMC cancer*. 2010;10:447.
116. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in medicine*. 2002;21(11):1539-58.
117. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015;4:7.
118. Staley JR, Blackshaw J, Kamat MA, Ellis S, Surendran P, Sun BB, et al. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2016;32(20):3207-9.
119. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature genetics*. 2013;45(6):580-5.
120. Candille SI, Absher DM, Beleza S, Bauchet M, McEvoy B, Garrison NA, et al. Genome-wide association studies of quantitatively measured skin, hair, and eye pigmentation in four European populations. *PLoS one*. 2012;7(10):e48294.
121. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nature genetics*. 2008;40(7):886-91.
122. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nature genetics*. 2013;45(10):1238-43.
123. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376-81.

124. Day FR, Ruth KS, Thompson DJ, Lunetta KL, Pervjakova N, Chasman DI, et al. Large-scale genomic analyses link reproductive aging to hypothalamic signaling, breast cancer susceptibility and BRCA1-mediated DNA repair. *Nature genetics*. 2015;47(11):1294-303.
125. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, et al. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Annals of internal medicine*. 2009;151(8):528-37.
126. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(4):940-9.
127. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology*. 1992;10:411-52.
128. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(1):209-19.
129. Gaudet MM, Egan KM, Lissowska J, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernstoff L, et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (TNF-LTA) and breast cancer risk. *Human genetics*. 2007;121(3-4):483-90.
130. Nieves-Ramirez ME, Partida-Rodriguez O, Alegre-Crespo PE, Tapia-Lugo Mdel C, Perez-Rodriguez ME. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor alpha Promoter Region and in Lymphotoxin alpha in Squamous Intraepithelial Lesions, Precursors of Cervical Cancer. *Translational oncology*. 2011;4(6):336-44.
131. Suzuki G, Cullings H, Fujiwara S, Matsuura S, Kishi T, Ohishi W, et al. LTA 252GG and GA genotypes are associated with diffuse-type noncardia gastric cancer risk in the Japanese population. *Helicobacter*. 2009;14(6):571-9.
132. Yu X, Huang Y, Li C, Yang H, Lu C, Duan S. Positive association between lymphotoxin-alpha variation rs909253 and cancer risk: a meta-analysis based on 36 case-control studies. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(3):1973-83.
133. Howell WM, Turner SJ, Collins A, Bateman AC, Theaker JM. Influence of TNFalpha and LTalpha single nucleotide polymorphisms on susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma in the British population. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 2002;29(1):17-23.
134. Belbasis L, Stefanaki I, Stratigos AJ, Evangelou E. Non-genetic risk factors for cutaneous melanoma and keratinocyte skin cancers: An umbrella review of meta-analyses. *Journal of dermatological science*. 2016;84(3):330-9.
135. Gu F, Chen TH, Pfeiffer RM, Fagnoli MC, Calista D, Ghiorzo P, et al. Combining common genetic variants and non-genetic risk factors to predict risk of cutaneous melanoma. *Human molecular genetics*. 2018.
136. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective. Continuous Update Project Expert Report. 2018.
137. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2008;67(3):253-6.
138. Zhang YP, Chu RX, Liu H. Vitamin A intake and risk of melanoma: a meta-analysis. *PLoS one*. 2014;9(7):e102527.
139. Wang J, Li X, Zhang D. Coffee consumption and the risk of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *European journal of nutrition*. 2016;55(4):1317-29.



140. Stucci LS, D'Oronzo S, Tucci M, Macerollo A, Ribero S, Spagnolo F, et al. Vitamin D in melanoma: Controversies and potential role in combination with immune check-point inhibitors. *Cancer treatment reviews*. 2018;69:21-8.
141. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *International journal of epidemiology*. 2003;32(1):1-22.
142. Cornelis MC, Byrne EM, Esko T, Nalls MA, Ganna A, Paynter N, et al. Genome-wide meta-analysis identifies six novel loci associated with habitual coffee consumption. *Molecular psychiatry*. 2015;20(5):647-56.
143. Ferrucci L, Perry JR, Matteini A, Perola M, Tanaka T, Silander K, et al. Common variation in the beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating levels of carotenoids: a genome-wide association study. *American journal of human genetics*. 2009;84(2):123-33.
144. Mondul AM, Yu K, Wheeler W, Zhang H, Weinstein SJ, Major JM, et al. Genome-wide association study of circulating retinol levels. *Human molecular genetics*. 2011;20(23):4724-31.
145. Jiang X, O'Reilly PF, Aschard H, Hsu YH, Richards JB, Dupuis J, et al. Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nature communications*. 2018;9(1):260.
146. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(21):3555-7.
147. Machiela MJ, Chanock SJ. LDassoc: an online tool for interactively exploring genome-wide association study results and prioritizing variants for functional investigation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2018;34(5):887-9.
148. Sheehan NA, Didelez V, Burton PR, Tobin MD. Mendelian randomisation and causal inference in observational epidemiology. *PLoS medicine*. 2008;5(8):e177.
149. Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: effect estimation and bias detection through Egger regression. *International journal of epidemiology*. 2015;44(2):512-25.
150. Bowden J, Davey Smith G, Haycock PC, Burgess S. Consistent Estimation in Mendelian Randomization with Some Invalid Instruments Using a Weighted Median Estimator. *Genetic epidemiology*. 2016;40(4):304-14.
151. Han C. Detecting invalid instruments using L1-GMM. *Economics Letters*. 2008;101(3):285-7.
152. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 2007;81(3):559-75.
153. Yang J, Ferreira T, Morris AP, Medland SE, Madden PA, Heath AC, et al. Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits. *Nature genetics*. 2012;44(4):369-75, s1-3.
154. Bowden J, Del Greco MF, Minelli C, Davey Smith G, Sheehan N, Thompson J. A framework for the investigation of pleiotropy in two-sample summary data Mendelian randomization. *Statistics in medicine*. 2017;36(11):1783-802.
155. Pierce BL, Burgess S. Efficient design for Mendelian randomization studies: subsample and 2-sample instrumental variable estimators. *American journal of epidemiology*. 2013;178(7):1177-84.
156. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature genetics*. 2013;45(11):1274-83.

157. Shin SY, Fauman EB, Petersen AK, Krumsiek J, Santos R, Huang J, et al. An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nature genetics*. 2014;46(6):543-50.
158. Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nature genetics*. 2013;45(2):145-54.
159. Chasman DI, Pare G, Mora S, Hopewell JC, Peloso G, Clarke R, et al. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis. *PLoS genetics*. 2009;5(11):e1000730.
160. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, Luan J, et al. Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nature genetics*. 2012;44(9):991-1005.
161. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature genetics*. 2010;42(5):441-7.
162. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466(7307):707-13.
163. Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai SL, et al. Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in human brain. *PLoS genetics*. 2010;6(5):e1000952.
164. Pattaro C, Teumer A, Gorski M, Chu AY, Li M, Mijatovic V, et al. Genetic associations at 53 loci highlight cell types and biological pathways relevant for kidney function. *Nature communications*. 2016;7:10023.
165. Yang K, Fung T, Nan H. An epidemiological review of diet and cutaneous malignant melanoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2018.